VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR MUTAGENITÄT IN DEN TESTSYSTEMEN CHLAMYDOMONAS UND SALMONELLA UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG EINER EXOGENEN METABOLISCHEN AKTIVIERUNG

von

Günter Robisch

aus Schrobenhausen

Diss
Erlangen
1986

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR MUTAGENITÄT IN DEN TESTSYSTEMEN CHLAMYDOMONAS UND SALMONELLA UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG EINER EXOGENEN METABOLISCHEN AKTIVIERUNG

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

von

Günter Robisch
aus Schrobenhausen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 7.2.1986

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. K. Brodersen

Erstberichterstatter: Priv. Doz. Dr. O. Schimmer

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. C. G. Arnold

Verwendete Abkürzungen und Symbole:

2-AA = 2-Aminoanthracen
9-AA = 9-Aminoacridin
c = Konzentration
Cl = Clophen A 50
CPA = Cyclophosphamid
DMN = Dimethylnitrosamin
DMSO = Dimethylsulfoxid
ENU = Ethylnitrosoharnstoff
K = Kontrolle
MNNG = N-methyl-N`-nitro-N-nitrosoguanidin
MR = Mutationsrate
MC = Methylcholanthren
5-MOP = 5-Methoxypsoralen (Bergapten)
8-MOP = 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)
NaIC = Natrium-DL-Isocitrat
2-NF = 2-Nitrofluoren
Na-azid = Natriumazid
4-NOPD = 4-Nitro-o-phenylendiamin
PB = Phenobarbital
PK = Positivkontrolle
rel. ÜR = relative Überlebensrate
SA = Standardabweichung
U = unbehandelt

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538110_0004

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Das metabolisierende System	6
2.2.	Chlamydomonas als Testorganismus	8
2.2.1.	Teststämme und Testsystem	8
2.2.2.	Medien und Lösungen	9
2.2.3.	Versuchsaufbau und -durchführung	11
2.2.4.	Wachstum und Auswertung	13
2.3.	Salmonella als Testorganismus	16
2.3.1.	Teststämme und Testsystem	16
2.3.2.	Medien und Lösungen	18
2.3.3.	Versuchsaufbau und -durchführung	20
2.3.4.	Wachstum und Auswertung	21
2.4.	Testsubstanzen	23
2.4.1.	Alkylierende Agentien	23
2.4.1.1.	Ethylnitrosoharnstoff	24
2.4.1.2.	2-Nitrofluoren	25
2.4.1.3.	Dimethylnitrosamin	26
2.4.1.4.	Cyclophosphamid	27
2.4.2.	Naturstoffe	29
2.4.2.1.	Quercetin	29
2.4.2.2.	ß-Asaron	30
2.4.2.3.	Aristolochiasäuren	32
2.4.2.4.	Bergapten	34
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Untersuchungen von alkylierenden Agentien in Chlamydomonas	36
3.1.1.	Einfluß von ENU auf die relative Überlebens- und Reversionsrate	36

Seite

3.1.2. Einfluß von 2-NF auf die relative Überlebens- und Reversionsrate 40
3.1.3. Einfluß von DMN auf die relative Überlebens- und Reversionsrate 40
3.1.4. Einfluß von CPA auf die relative Überlebens- und Reversionsrate 48

3.2. Vergleichende Untersuchungen zur Mutagenität ausgewählter Naturstoffe in den Testsystemen Chlamydomonas und Salmonella 53
3.2.1. Untersuchungen zur Mutagenität von Quercetin 53
3.2.2. Untersuchungen zur Mutagenität von ß-Asaron 59
3.2.3. Untersuchungen zur Mutagenität von Aristolochiasäuren 65
3.2.4. Untersuchungen zur Mutagenität von Bergapten 75

4. Diskussion 81

5. Zusammenfassung 101

6. Literaturverzeichnis 103

1. Einleitung

Im Laufe der letzten 20 Jahre hat das Interesse an der Kanzerogenese durch chemische Substanzen immer mehr an Bedeutung gewonnen. Damit parallel verlief die Suche nach Methoden, mit deren Hilfe das kanzerogene Potential neuer, aber auch altbekannter Substanzen möglichst schnell geprüft werden kann. Kanzerogene Versuche am Tier sind sehr aufwendig und erfordern einen Zeitaufwand, der sich über Jahre hinweg erstrecken kann. Untersuchungen zur Mutagenität mit Mikroorganismen benötigen dagegen nur einen geringen Zeitaufwand und sind zudem kostengünstiger als Langzeittierversuche.

Seit der enge Zusammenhang von Mutagenität und Kanzerogenität bekannt ist, hat deshalb die praktische Mutationsforschung immer mehr an Bedeutung gewonnen. Untersuchungen zur Mutagenität einer Substanz erwiesen sich dabei als wertvolle Hilfe bei der Risikoabschätzung des kanzerogenen Potentials natürlich vorkommender und synthetischer chemischer Substanzen.
Mutationen können sich auf verschiedenen Ebenen manifestieren. Genmutationen umfassen das Spektrum von kleinsten molekularen Veränderungen bis hin zu submikroskopischen Strukturveränderungen der DNA Sequenzen. Die kleinste Veränderung, die zu einer Mutation führt, ist die Umwandlung eines Basenpaares - die sogenannte Basenpaarmutation. Während Basenpaarmutationen grundsätzlich mit der Bildung neuer kovalenter Bindungen verbunden sind, verändert eine Reihe chemischer Agentien die Nukleinsäurestruktur ohne kovalente Bindung. Diese sogenannten Frame-Shift-Mutationen werden durch Interkalation von flachen Molekülen wie z.B. Acridinverbindungen zwischen die Basen des DNA-Stranges induziert (Gebhart 1977).

Für derartige Untersuchungen ist eine Vielzahl von Kurzzeittestsystemen unter anderem mit Mikroorganismen entwickelt

worden (Hollstein et al 1979). Dabei wurde wiederholt in jüngster Zeit eine hohe Korrelation zwischen mutagener und kanzerogener Wirkung für verschiedene chemische Substanzklassen nachgewiesen (McCann et al 1975, De Serres 1976, Sugimura 1978). Der Ames Test, ein Testsystem für in-vitro Mutagenitätsuntersuchungen an Salmonella typhimurium Stämmen unter gleichzeitiger Einwirkung einer metabolisierenden Mikrosomenfraktion aus Rattenleber, ist das sicherlich bekannteste mikrobielle prokaryotische Testsystem (Maron et al 1983). Es eignet sich gut für den Nachweis bestimmter Punktmutationen (Basenpaarmutationen und Frame-Shift-Mutationen) und ermöglicht durch die metabolisierende Komponente im Testsystem auch den Nachweis indirekt wirkender Mutagene.
Die Integration eines metabolisierenden Systems ist deshalb von eminenter Bedeutung, weil bekannt ist, daß viele Substanzen nicht per se kanzerogen bzw. mutagen wirken (Miller et al 1971), sondern erst metabolisch in reaktive Zwischenprodukte überführt werden müssen. Erst diese "ultimativen Kanzerogene bzw. ultimativen Mutagene" sind in der Lage, mit der DNA in Wechselwirkung zu treten oder mit ihr chemisch zu reagieren.
Die Metabolisierung von Fremdstoffen findet in vivo hauptsächlich in den Leberzellen, den Hepatozyten,statt. Zwei Strukturen der Zelle kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Zum einen ist es das glatte endoplasmatische Reticulum, das sich bei der Zentrifugation von Zellbestandteilen in die Mikrosomen umwandelt. Zum anderen sind es die Mikrokörper - - von einfachen Membranen umgebene Cytoplasmaorganelle - die für die Fremdstoffmetabolisierung in Frage kommen (Bonse et al 1978). Beide Komponenten sind im sogenannten S9, dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten exogenen metabolisierenden System, enthalten. Die metabolische Veränderung von Fremdsubstanzen hat den Sinn, unpolare Moleküle in polare und somit in gut ausscheidbare Substanzen umzuwandeln. Häufig entstehen jedoch im Zuge der metabolischen Umwandlung chemisch reaktive Produkte, die zur Reaktion mit essentiellen

Makromolekülen der Zelle befähigt sind. Da in der Zelle aber auch Prozesse ablaufen, die zur Deaktivierung reaktiver Moleküle führen, hängt die genotoxische Wirkung vieler Stoffe vom Ausmaß der metabolischen Aktivierungs- und Deaktivierungsreaktionen ab.
Chemisch reaktionsfähige Metaboliten werden meist bei den Funktionalisierungsreaktionen, den sogenannten Phase I Reaktionen gebildet. Sie umfassen im wesentlichen Oxidationen und Reduktionen. Für die meisten metabolischen Fremdstoffoxidationen wird molekularer Sauerstoff verwendet, der durch ein besonderes Enzymsystem (Cytochrom P_{450} abhängige Monooxigenase) aktiviert wird. Wichtige Cytochrom P_{450} katalysierte Oxidationsreaktionen sind vor allem: aliphatische Hydroxylierungen, Epoxidation von Aromaten, aromatische Hydroxylierungen, N,S-Hydroxylierungen, N,S-Oxidationen, Dealkylierungen, Deaminierungen, Epoxidierung von Alkenen und Alkinen und Desulfurierungen (Pfeifer et al 1980). Reduktive Biotransformationen sind vor allem für Aldehyde und Ketone (zu Alkoholen) sowie für Nitro- und Azoverbindungen von Bedeutung, aus denen unter Durchlaufen verschiedener Oxidationsstufen (Nitroso- und Hydroxylamin- bzw. Hydrazoverbindungen) letztlich Amine entstehen (Pfeifer et al 1980).

Die Konjugationsreaktionen oder auch Phase II Reaktionen bewirken eine Erhöhung der Polarität lipophiler Stoffe. Durch die Konjugation eines Fremdstoffes oder seines Phase I Metaboliten mit einem aus dem Intermediärstoffwechsel bereitgestellten Moleküls, wird eine gute Ausscheidbarkeit des Fremdstoffes erreicht. Eine Inaktivierung der anfangs gebildeten Metaboliten kann somit durch die Phase II Reaktionen, die auch durch Enzyme katalysiert werden, erfolgen. Diese Enzyme sind Bestandteil der mikrosomalen Fraktion und des Cytoplasmas. Typische Beispiele für Phase II Reaktionen sind die Glucuronidierung, Sulfatierung, Acetylierung und die Glutathionkonjugation (Pfeifer et al 1980).

Neben prokaryotischen Testorganismen finden aber auch eukaryotische Mikroorganismen bei Mutagenitätsuntersuchungen Verwendung. Diese bieten gegenüber den prokaryotischen Organismen den Vorteil einer höher entwickelten DNA Organisation, wie man sie auch bei Säugerzellen findet. Bekanntester Vertreter dieser Gruppe von Testorganismen dürfte der Ascomycet Saccharomyces cerevisiae sein (Zimmermann 1973).

Auch Chlamydomonas reinhardii, ein einzelliger eukaryotischer Organismus aus der Familie der Chlamydomonadaceae eignet sich für genetische Studien (Schimmer 1975, Schimmer 1981). Der Nachweis bestimmter Punktmutationen ist mit diesen Phytoflagellaten möglich. Allerdings wurden an dieser einzelligen Grünalge bisher erst sehr wenige Substanzen auf ihre mutagene Wirkung hin untersucht. Vor allem Furocumarine (Schimmer 1981), aber auch einige alkylierende Agentien (Gillham 1965, Ranneberg et al 1968, Schimmer et al 1975, Hawks et al 1976) wurden erfolgreich als Mutagene in Chlamydomonas eingesetzt. Obwohl bekannt war, daß der Zusatz einer metabolisierenden Mikrosomenfraktion aus Rattenleber auf Chlamydomonas nicht toxisch wirkt (Bader 1980), liegen bisher in der Literatur keine positiven Befunde zum Nachweis der mutagenen Wirkung von Substanzen, die eine exogene metabolische Aktivierung benötigen, um mutagen zu wirken, vor.

In der praktischen Mutationsprüfung gewinnt der Einsatz von sogenannten Testbatterien immer mehr an Bedeutung. Dabei werden unterschiedliche Organismen mit unterschiedlicher DNA Organisation und unterschiedlichen Stoffwechsel- und damit Aktivierungsbedingungen eingesetzt um das mutagene Potential chemischer Substanzen zu bestimmen. Jedes der eingesetzten Testsysteme liefert dabei seinen Beitrag zur Gesamtabschätzung des genetischen Risikos einer Substanz.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Testsysteme für Genmutationen miteinander verglichen. Als Modell für ein eukaryotisches System zur Erfassung von Gen-

mutationen diente der Phytoflagellat Chlamydomonas reinhardii. Diesem weniger bekannten Testsystem stand als vergleichendes System der prokaryotische Salmonella/Mikrosomen Test gegenüber. An Hand bekannter, allerdings im Chlamydomonassystem noch nicht untersuchter Standardmutagene, aber auch durch die Prüfung von noch nicht untersuchten Substanzen, die aus dem Bereich der Naturstoffe gewählt wurden, sollte eine Evaluierung des Chlamydomonassystems, sowohl mit als auch ohne metabolisierender Komponente, im Vergleich zum Salmonellasystem durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Das metabolisierende System

Als metabolisierendes System wurde der sogenannte S9-Mix, eine aus Ratten gewonnene Leberfraktion, die mit Kofaktoren versetzt wurde,gewählt. Die Herstellung erfolgte in Zusammenarbeit mit Fr.Dr. Göggelmann und Mitarbeitern in den Labors der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH (GSF).

Herstellung des S9

Männlichen Wistar-Ratten, die der GSF-eigenen Tierzuchtanstalt entstammten, wurde zu diesem Zweck die Leber entnommen, mit der Schere zerkleinert und mehrmals in steriler Saline gewaschen. Pro 1g Leber wurden 3 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) zugesetzt und zusammen in einem Potter homogenisiert. Dieses Homogenat wurde anschließend 15 min. bei 9000 x g zentrifugiert. Im Überstand der die S9 Fraktion darstellt, wurde im Anschluß der Proteingehalt bestimmt. Die dazu eingesetzte Biuretmethode ist das verbreitetste Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eiweiß und beruht auf einer Farbreaktion des Biuretreagens bei Zugabe von Eiweiß.Durch Messung der Extinktion des mit Biuretreagenz versetzten S9 ist es somit möglich, den Proteingehalt der jeweiligen Präparation quantitativ zu erfassen. Er beträgt in der Regel 28 mg - 40 mg Protein pro ml S9 Fraktion. Durch Verdünnen mit Phosphatpuffer wurde für jede S9 Präparation ein Standardproteingehalt von 25 mg/ml eingestellt. Der S9 wurde daraufhin steril filtriert und portionsweise bei -80° C eingefroren und gelagert. Erst unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die benötigten Portionen bei Raumtemperatur aufgetaut und mit den Kofaktoren versetzt.
Es sind mittlerweile eine Reihe von Fremdstoffen bekannt geworden, die zu einer Vermehrung der mikrosomalen Enzyme führen. So induziert Clophen A 50, eine Chemikalie,die aus ca. 60 verschiedenen Biphenylen unterschiedlichen Chlorierungsgrades be-

steht, eine vermehrte Bildung von P_{448} und P_{450} bei den Monooxigenasen. Phenobarbital dagegen induziert nur eine Erhöhung der P_{450} - und Methylcholanthren nur der P_{448} - Aktivitäten (Maron et al 1983).

In den meisten Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde S9,der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, verwendet. Die Vorbehandlung wurde durch eine Verabreichung von 500 mg Clophen A 50/Kg Lebendgewicht mittels einer Schlundsonde 5 Tage vor der Präperation der Tiere von Mitarbeitern der Tierzuchtanstalt der GSF durchgeführt. In einigen Versuchen kam aber auch der Einsatz von S9, der von unbehandelten Tieren, von mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren (0,1% als Zusatz im Trinkwasser 10 Tage lang vor der Präperation) und mit 3-Methylcholanthren vorbehandelten Tieren (100 mg/Kg Lebendgewicht 2 Tage vor der Präperation durch eine Schlundsonde verabreicht) zur Anwendung.

In der Regel betrug der Proteingehalt des exogenen Aktivierungssystems 2,5 mg Protein/ml S9-Mix. Abweichungen von diesem Proteingehalt sind ebenso wie die Verwendung von S9, der nicht von den mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, an entsprechender Stelle angegeben.

Der S9-Mix enthielt pro ml: 0,05 ml - 0,4 ml S9; 7 mM $MgSO_4$; 4 mM $NADP^+$; 20 mM D,L-Isocitrat; in 70 mM Phosphatpuffer.

Lösungen der Kofaktoren des S9-Mix

$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,725 g in 100 ml Aqua bidest.
$NADP^+$	3,149 g in 100 ml Aqua bidest.
Na-DL-Isocitrat	5,880 g in 100 ml Aqua bidest.

Phosphatpuffer

K_2HPO_4	17,418 g
KH_2PO_4	13,609 g
Aqua bidest.	1000 ml pro Chemikalie

Die K_2HPO_4-Lösung wurde solange mit KH_2PO_4-Lösung versetzt,bis sich ein pH von 7,4 in der Pufferlösung eingestellt hatte.

2.2. Chlamydomonas als Testorganismus

Die einzellige Grünalge Chlamydomonas (Volvocales, Chlorophyta) wurde als einer der ersten Mikroorganismen für genetische Untersuchungen eingesetzt (Pascher 1916). Wie bei Bakterien können aus dem Spektrum der möglichen Mutationstypen jedoch nur bestimmte Genmutationen erfaßt werden.Als Eukaryot bietet Chlamydomonas jedoch den Vorteil, daß die Wirkung auf chromosomal organisierte DNA erfaßt werden kann. Darüber hinaus verfügt Chlamydomonas auch über extranukleäre DNA (Arnold 1970), deren Gene in genetische Tests mit einbezogen werden können. Die nukleäre DNA dieses Organismus, der sich sowohl photoautotroph als auch heterotroph und mixotroph ernähren kann, liegt auf 16 Kopplungsgruppen (O`Brien 1982).

2.2.1. Teststämme und Testsystem

Aus dem Wildtyp Chlamydomonas reinhardii (WT, Paarungstyp -, Stamm 137c) wurde eine Reihe von Mutanten erhalten,die sich für Mutagenitätsuntersuchungen eignen. Für quantitative Studien eignet sich, Untersuchungen von Schimmer (1977) zufolge, vor allem eine argininabhängige Mutante von Chlamydomonas reinhardii. Die argininabhängige Mutante arg 1^-, Paarungstyp -, wurde uns von Dr. Loppes, Universität Lüttich, freundlicherweise überlassen. Sie stammt ursprünglich aus dem Labor von Prof. Levine, der sie nach Bestrahlung des Wildtyps mit kurzwelligen UV-Licht erhielt. Die Argininabhängigkeit ist kernkodiert. Der Defekt liegt auf der Kopplungsgruppe 1 und bewirkt den Ausfall des Enzyms Acetyl-Glutamyl-Phosphat-Reduktase, das am Biosyntheseweg der Aminosäure Arginin beteiligt ist (Loppes 1972). Der Mutationsschritt arg^- zu Arg^+ dient als Indikator für eine Mutationsinduktion. Dieser Reversionsschritt erfolgt spontan relativ selten. Echte Rückmutanten sind bisher weder spontan, noch nach Mutagenese gefunden worden. Die Mehrzahl der Arg^+ Revertanten entsteht über Suppressormutationen (Loppes 1969).

Neben der argininbedürftigen Mutante fand die streptomycinabhängige Mutante sd-3-18, Paarungstyp -, in dieser Arbeit Verwendung. Sie wurde durch Einwirkung von Nitrosoguanidin auf den Wildtyp gewonnen (Gillham 1965). Die sd-3-Mutation ist extranukleär kodiert. Nach Untersuchungen von Schimmer und Arnold (1970) und Behn und Arnold (1974) liegt der Erbträger vermutlich auf den Mitochondrien. Der Mutationsschritt str^d nach Str^s (streptomycinunabhängige Mutante) dient als Indikator für eine Mutationsinduktion in diesem System. Er ist ebenfalls in der Regel ein Reversionsschritt.

2.2.2. Medien und Lösungen

Standardlösungen

Lösung A

NH_4CL	8g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2g
$CaCl_2 \cdot H_2O$	1g
Aqua bidest.	1000ml

Spurenelementlösung

EDTA	5g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,2g
H_3BO_3	1,14g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,51g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,49g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,16g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,16g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\ 4H_2O$	0,11g
Aqua bidest.	100ml

Magnesiumsulfatlösung

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	24,6g
Aqua bidest.	100ml

Phosphatpuffer

KH_2PO_4	7,26g
K_2HPO_4	14,34g
Aqua bidest.	1000ml

Minimalmedium (M)

Lösung A	50ml
Phosphatpuffer	50ml
Spurenelementlösung	1ml
Magnesiumsulfatlösung	1ml
Aqua bidest.	900ml

Anzuchtmedien

Zur Anzucht der arg 1^- Zellen wurde das Minimalmedium mit 50 µg Arginin · HCl/ml supplementiert (M+Arg 50). Zur Bereitung der Festmedien wurde zusätzlich 1,5% Agar (Bacto Difco) zugegeben.
Zur Anzucht der sd-3-18 Zellen wurde dem abgekühltem Minimalmedium Streptomycinsulfat (6,25µg/ml) zugesetzt. Zur Herstellung der Festmedien (SM-125-Platten) wurde dem Minimalmedium 1,5% Agar und 125 µg Streptomycinsulfat pro ml zugegeben.

Selektionsmedien

Die Selektion der Arg^+ Revertanten erfolgte auf Minimalagarplatten, die zusätzlich 10µg Arginin · HCl/ml enthielten (M+Arg 10). Die Bestimmung der Überlebenden erfolgte ebenfalls auf M+Arg 10-Platten.
Die Selektion der Str^SRevertanten erfolgte auf Minimalmediumplatten (M). Für die Bestimmung der Überlebenden wurden SM-125-Platten verwendet.

Die Sterilisation der Medien erfolgte durch 30-minütiges Autoklavieren bei 120° Celsius und einer Atmosphäre Überdruck. Arginin HCl wurde vor dem Sterilisieren zugegeben und mitautoklaviert. Streptomycinsulfat wurde steril abgewogen, in sterilem Wasser gelöst, und dem abgekühlten Minimalmedium zugesetzt.
Die Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Streptomycin wurde von der Firma Serva bezogen.

2.2.3. Versuchsaufbau und Durchführung

Anzucht der Kulturen

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde von einem etwa 5 Tage altem Klon auf Festmedium etwas abgenommen, in sterilem Anzuchtmedium suspendiert und in den Anzuchtskolben überimpft. Die Algen wurden im Lichtring (Philips Radium NL 32 W/32C, etwa 20000 Lux) bei Dauerlicht und kontinuierlicher Begasung mittels einer Aquariumpumpe bei etwa konstanter Temperatur von 25° Celsius bis zu einer Zelldichte von 10^5 bis 10^6 Zellen pro ml (Ende der logarithmischen Wachstumsphase) angezogen.

Mutationsinduktion

Die Versuchsdurchführung erfolgte mit Ausnahme der Versuche mit Bergapten immer nach dem in Abbildung 1 dargestellten Schema. Für jeden Ansatz einer Versuchsreihe wurden jeweils 100 ml Algensuspension verwendet. Diese wurden auf 7 ml eingeengt und anschließend in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die Einengung der Ausgangssuspension auf jeweils 7 ml

wurde durch 5-minütiges Abzentrifugieren bei 5000 U/min und anschließendes Resuspendieren vor der eigentlichen Behandlung durchgeführt.
Durch Zusatz von 3 ml Puffer 1+2 (1 Teil Phosphatpuffer + 2 Teile Aqua bidest.) bzw. 3ml S9-Mix in den Versuchsansätzen mit exogener metabolisierender Komponente, wurde auf ein Endvolumen des Testansatzes von 10 ml ergänzt.
Die Testansätze wurden anschließend mit der Testsubstanz versetzt und jeweils gleichzeitig innerhalb derselben Versuchsreihe sowohl mit als auch ohne metabolisierende Komponente untersucht.
Die Behandlungsdauer betrug in der Regel eine Stunde. Während dieser Zeit wurden die Erlenmeyerkolben in einem belichteten Schüttelwasserbad (Temperatur 37° C) leicht bewegt. Eine Erhöhung der Behandlungstemperatur und eine Behandlungsdauer von einer Stunde erschienen unter folgenden Gesichtspunkten sinnvoll:
Zum einen stellt eine Temperatur von 37° C für die im S9-Mix entstandenen Enzyme eine optimale Arbeitstemperatur dar. Zum anderen kann die Mutagenität von Testsubstanzen in Verbindung mit S9-Mix, wie aus anderen Testsystemen bekannt (Yahagi 1977), mit zunehmender Inkubationszeit besser nachgewiesen werden.
Durch Vorversuche konnte eine Schädigung der Algen durch eine 1-stündige Temperaturerhöhung auf 37° C ausgeschlossen werden. Ebenso konnte durch diese Versuche auch belegt werden, daß der S9-Mix solitär im Testansatz die Spontanmutationsraten von Chlamydomonas reinhardii nicht verändert.

Bei einigen Versuchen betrug die Behandlungsdauer allerdings 24 Stunden. Eine längere Verweildauer der Algensuspension bei 37° C über einen Zeitraum, der erheblich über 1 Stunde hinausreichte, machte sich aber in einer erhöhten Absterberate der Algen bemerkbar. Da bekannt ist (Arni 1984), daß der S9-Mix auch bei niedrigeren Temperaturen, wenn auch mit

eingeschränkter Effektivität aktiv ist, erschien eine Inkubationszeit von einer Stunde bei 37° C und eine anschliessende Verweildauer von 23 Stunden bei Raumtemperatur im belichteten Schüttler sinnvoll. Bei diesen Langzeitversuchen erfolgte die Resuspension der abzentrifugierten Algen bei der arg 1^- Mutante in frischem M + Arg 50 Medium.Bei der sd-3-18 Mutante wurde frisches Minimalmedium verwendet,um toxische Einflüsse von Streptomycin auf die Revertanten auszuschließen.
Die einzelnen Ansätze wurden nach der Behandlung 5 Minuten bei 5000 U/min abzentrifugiert. Das so erhaltene Algenpellet wurde anschließend zweimal mit je 10 ml Phosphatpuffer 1+2 gewaschen und danach in 2 ml Phosphatpuffer 1+2 resuspendiert. Davon wurden jeweils 0,1 ml auf 8 Platten Festmedium ausgespatelt (Ermittlung der Revertanten). 0,5 ml des Resuspendats wurden in Zehnerschritten bis zu einer Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-5} in Phosphatpuffer 1+2 verdünnt. Von diesen Verdünnungsstufen wurden jeweils 0,1 ml auf 6 Agar-Platten ausgestrichen (Ermittlung der Gesamt- bzw. Überlebenszellzahlen).
Bei den Bergaptenversuchen wurden die 10 ml des Inkubationsansatzes in sterile Falconfläschchen (Gewebekulturflaschen mit Schraubverschluß, Wachstumsfläche 25 cm^2) pipettiert. Der Testansatz wurde anschließend der UV-A-Bestrahlung (Raumbestrahlungsstärke 2W/m^2) ausgesetzt. Die weitere Behandlung der Algen erfolgte nach der schon erläuterten Methode.

2.2.4. Wachstum und Auswertung

Nach dem Antrocknen der ausgestrichenen Algensuspension auf den Agarplatten, wurden diese ins Dauerlicht gestellt (Weißlicht, ca. 5000 Lux Beleuchtungsstärke, Klimaraum mit einer Temperatur von etwa 25° C). Die Toxizität wurde über die koloniebildenden Zellen gemessen.Zellverluste durch Zentrifugation sind durch diese Art der Toxizitätsmessung versuchsbedingt.Bei den sogenannten Überlebenden handelt es sich also um ausplattierte Chlamydomonaszellen,die zur Koloniebildung

fähig sind. Inaktivierte Zellen sind nicht mehr in der Lage Kolonien zu bilden bzw. sterben auf dem Stadium der Mikrokolonien ab. Eine Unterscheidung zwischen den letal geschädigten und koloniebildungsunfähigen Zellen kann nicht getroffen werden. Der Wert der Kontrolle (Ausgangszellzahl) wurde als Richtwert definiert und auf 100% festgesetzt. Die Zahl der Koloniebildner der behandelten Serien wurde prozentual darauf bezogen.
Die Auswertung der Ausgangszellzahlen und der Überlebenszellzahlen konnte nach 7 - 10 Tagen bei der arg 1^- Mutante und nach ca. 14 Tagen bei der sd-3-18 Mutante vorgenommen werden. Die Mutagenität wurde an der Zahl der auftretenden Revertanten, die als einzelne grüne Kolonien auf einem verblaßten Rasen abgestorbener Zellen zu erkennen sind, gemessen. Die Arg^+ Revertanten konnten nach 15 - 20 Tagen, die Str^s Revertanten nach etwa 25 Tagen ausgezählt werden. Die Mutationsrate errechnet sich aus der Revertantenzahl dividiert durch die Zahl der Überlebenden und wurde auf Revertanten pro 10^8 Zellen bezogen.

Statistik

Die dargestellten Ergebnisse stellen ebenso wie im Bakterienteil der Arbeit repräsentative Versuche aus einer Serie von mindestens 3 Einzelversuchen dar. Um die Ergebnisse darüber hinaus abzusichern, wurde eine statistische Überprüfung der Werte durchgeführt.
Die Standardabweichung der Überlebenden wurde als mittlerer Fehler der Einzelmessungen errechnet (68% Vertrauensbereich). Zur Berechnung der Standardabweichung der Reversionsraten wurde mit der Gauß´schen Fehlerfortpflanzung (Quotientenregel) gearbeitet, da die Überlebensrate, die ebensfalls mit einem mittleren Fehler behaftet ist, in die Berechnungen mit eingeht. Für die Signifikanzprüfung wurde der t-Test eingesetzt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1% gelten dabei als signifikant ($\alpha < 0{,}01$). Unterschiede bei denen die Irrtumswahrscheinlichkeit mehr als 5% beträgt ($\alpha > 0{,}05$) sind als nicht signifikant anzusehen (Sachs 1979).

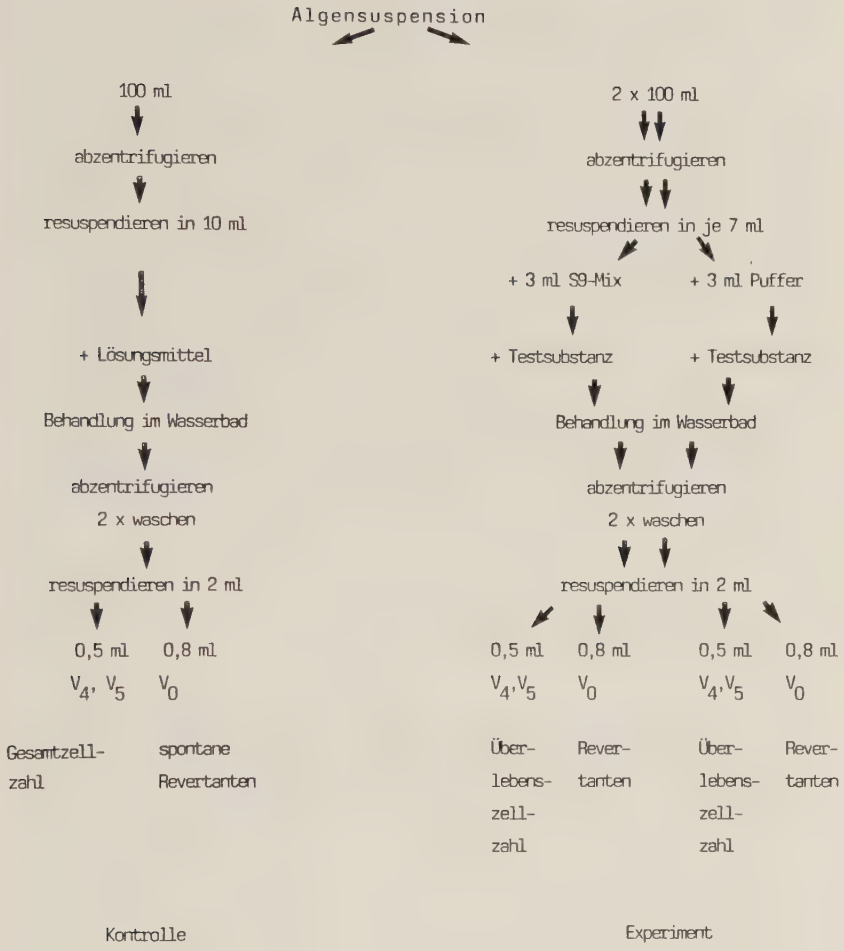


Abbildung 1: Schema der Versuchsdurchführung, dargestellt an einem Ansatz.

2.3. Salmonella als Testorganismus

Das gramnegative, fakultativ aerobe Bakterium Salmonella typhimurium aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzt wie bei Bakterien üblich, ein sehr einfaches Arrangement des genetischen Materials mit nur einem kreisförmigen DNA-Molekül. Deshalb ist die DNA für jedes Mutagen, das in die Zelle eindringen kann, leichter zugänglich als die chromosomal organisierte DNA in eukaryotischen Zellen. Bakterielle Testsysteme eignen sich deshalb besonders gut für Mutagenitätsuntersuchungen. Ames et al entwickelten aus dem Stamm LT-2 von Salmonella typhimurium eine Anzahl speziell für Mutagenitätsuntersuchungen geeigneter Mutanten, deren Einsatz als Testorganismen im Salmonella-Mikrosomen- oder auch Ames Test- inzwischen weltweite Verbreitung fand (Maron et al 1983).

2.3.1. Teststämme und Testsystem

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Standardstämme TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 und TA 100 eingesetzt. Sie sind genetisch folgendermaßen charakterisiert:

Stamm	his-Mutation	weitere Mutationen
TA 1535	his G 46	uvr B rfa
TA 1537	his C 3076	uvr B rfa
TA 1538	his D 3052	uvr B rfa
TA 98	his D 3052	uvr B rfa R-Faktor
TA 100	his G 46	uvr B rfa R-Faktor

Alle Stämme sind Histidinmangelmutanten. Die Art der Mutation in der Bakterien- DNA, welche zur Histidin-Auxotrophie führt,

ist unterschiedlich. Auf Grund verschiedener Mutationen im Histidin-Operon (his G 46, his D 3052, his C 3076) können sie die zu ihrem Wachstum nötige Aminosäure nicht mehr synthetisieren. His G 46 ist eine Substitutionsmutation. His D 3052 und his C 3076 sind Frame-Shift-
- Mutationen.
Ein zweiter genetischer Defekt betrifft das Excisions-
- Repair- System (uvr B). Ein Verlust in der UV-Licht empfindlichen Region des Gens führt zum Verlust dieses Repairsystems. Diese Mutation schließt außerdem Nitrat-
-Reduktase und Biotingene ein. Biotin wird deshalb im Amestest substituiert.
Ein weiterer Defekt betrifft die Struktur der Bakterienzellwand. Die Ames-Test-Stämme haben auf Grund der rfa-Mutation defekte Lipopolysaccharide mit verkürzten Polysaccharidketten auf der Zelloberfläche. Außer den Seitenketten sind auch Teile der Kernzone und des Sockels der Bakterienwand durch die rfa-Mutation betroffen und fehlen zum Teil. Dadurch ist einerseits die Permeabilität der Zellwand stark erhöht. Andererseits sind die Testbakterien durch den Verlust der intakten Polysaccharidhülle völlig apathogen.
Die Teststämme TA 98 und TA 100 entsprechen TA 1538 bzw. TA 1535. Sie besitzen aber zusätzlich einen sogenannten R-Faktor (ein zusätzliches Stück DNA = Plasmid), der ihnen Resistenz gegen Ampicillin verleiht. Der Besitz dieses R-Faktors führt zu einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit dieser beiden Teststämme, weil er, auf noch nicht ganz geklärte Weise, mit dem Auftreten eines weiteren sehr fehleranfälligen Reparatursystems (SOS-Repair) gekoppelt ist.
Die genannten Teststämme wurden uns freundlicherweise von Prof. Ames, University of California, Berkeley, zugesandt.
Um die Mutagenität Nitrogruppen enthaltenderChemikalien näher untersuchen zu können, wurde zusätzlich eine weitere

Mutante von Salmonella typhimurium verwendet. TA 100 NR hat zusätzlich zu den für den Stamm TA 100 beschriebenen Mutationen einen weiteren Defekt. Ihm fehlt das Enzym der "klassischen Nitroreduktase". Dieser Stamm wurde von Prof. E. J. Rosenkranz,Case Western Reserve University, Cleveland, zur Verfügung gestellt.

In Gegenwart von mutagenen Substanzen kann es nun zu weiteren Mutationen in der DNA der Histidinmangelmutanten kommen. Solche Mutationen können prinzipiell alle Bereiche der DNA betreffen, unter anderem auch diesen Genort an dem sich der his^- Defekt befindet. Dabei kann es auch zu sogenanten Reversionen kommen, wobei die ursprüngliche zur Histidinbedürftigkeit führende Mutation durch eine zweite Mutation "rückgängig" gemacht wird. Dieser Prozeß der Rückmutation von der Histidinauxotrophie zur Histidinprototrophie spiegelt sich im Ames-Test darin wieder, daß nur rückmutierte Bakterienzellen auf Minimalagar zu wachsen vermögen und dabei makroskopisch sichtbare und zählbare Kolonien bilden. Die Anzahl dieser Kolonien - jede einzelne Kolonie entstand aus einer einzelnen rückmutierten Bakterienzelle - ist ein Maß für die Mutagenität einer Testsubstanz. Je mehr Mutationen eine Substanz in der Bakterien-DNA verursacht, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Revertanten.

2.3.2. Medien und Lösungen

Vogel-Bonner-Lösung

Aqua dest.	1000 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
Citronensäure $\cdot H_2O$	100 g
K_2HPO_4	500 g
$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	175 g

Histidin-Lösung	
L-Histidin . HCl	52,40 mg
Aqua dest.	500 ml
Biotin-Lösung	
Biotin	61 mg
Aqua dest.	500 ml
Minimalmedium	
Bacto-Difco-Agar	15 g
Vogel-Bonner-Lösung	20 ml
Glucose-Lösung	100 ml
Aqua dest.	880 ml
Vollmedium	
Bacto-Difco-Agar	15 g
Nutrient Broth (Difco)	8 g
NaCl	5 g
Aqua dest.	1000 ml
Anzuchtmedium (Übernachtmedium)	
Nutrient Broth (Difco)	0,8 g
NaCl	0,5 g
Aqua dest.	100 ml
Top Agar Medium	
Bacto-Difco-Agar	0,6 g
NaCl	0,5 g
Histidin-Lösung	10 ml
Biotin-Lösung	10 ml
Aqua dest.	100 ml
Medium für Keimzahlbestimmung	
NaCl	9 g
Aqua dest.	1 l
Glucose-Lösung	
Glucose, D (+)	200 g
Aqua dest.	1 l (Endvolumen)

Die Medien und Lösungen wurden bis auf folgende Ausnahmen durch 30 - minütiges Autoklavieren bei 120° C und einer Atmosphäre Überdruck sterilisiert:
NADP, NaIC, L-Histidin und Biotin wurden steril filtriert.
Die Glucose-Lösung wurde 60 Minuten bei 110° C autoklaviert.

Positivkontrollen (PK):
In den Versuchen mit Salmonella typhimurium wurden jeweils neben der Kontrolle (Leerwert) auch eine Positivkontrolle in die Versuchsdurchführung mit aufgenommen. Es fanden folgende Substanzen als Positivkontrollen Verwendung:

	-S 9	+ S 9
TA 1535:	Na-azid(0,5µg/Platte)	2-AA (1 µg/Platte)
TA 1538	4-NOPD (5µg/Platte)	2-AA (1 µg/Platte)
TA 1537	9-AA (50 µg/Platte)	2-AA (2,5 µg/Platte)
TA 98	4-NOPD (5 µg/Platte)	2-AA (1 µg/Platte)
TA 100	Na-azid(0,5 µg/Platte)	2-AA (1 µg/Platte)

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, und Boehringer, Mannheim, bezogen.

2.3.3. Versuchsaufbau und Durchführung

Stammkulturen
Bakterienstammkulturen erhält man durch Animpfen der entsprechenden Bakterienstämme im Vollmedium. Nach 6 bis 7 Stunden Schütteln im Wasserbad bei 37° C wurden die angewachsenen Kulturen mit Dimethylsulfoxid (0,07 ml pro 0,8 ml Kultur) versetzt und portionsweise bei -80° C eingefroren. Eine Charge dieser Kulturen wurde den Vorschriften von Maron und Ames (1983) entsprechend auf ihr induziertes Mutationsspektrum hin überprüft.

Anzucht der Kulturen
20 ml steriles Vollmedium wurden mit 0,4 ml einer aufgetauten Stammkulturlösung beimpft und 6 bis 7 Stunden im Wasserbad bei 37° C geschüttelt. 0,5 ml der angewachsenen Bakterienkulturen wurden entnommen und in Zehnerschritten bis

zu einer Konzentration von 10^{-6} in steriler NaCl-Lösung verdünnt. 0,1 ml dieser Konzentration wurden jeweils auf Vollmediumplatten ausgestrichen. Die Koloniezahlen auf diesen Platten wurden bestimmt und daraus der Keimgehalt berechnet. Erfahrungsgemäß befinden sich die Bakterienkulturen nach 6 bis 7 Stunden Wachstum in der logarithmischen Phase (Keimgehalt pro Platte 1,2 bis 2,4 mal 10^8 Bakterien) und sind für Mutagenitätsuntersuchungen besonders sensibel.

Mutationsinduktion

Zu 100 ml einer mit NaCl versetzten Agarlösung (ca. 43° C) wurden 10 ml einer 0,5 mM Histidin- und 10 ml einer 0,5 mM Biotin-Lösung pipettiert. 2 ml dieses flüssigen Topagars wurden mittels einer Dispensette in ein Reagenzglas gefüllt und mit 0,1 ml Bakterienkultur, 10 bis 50 µl Testsubstanz in Lösung und 0,5 ml S9-Mix bzw. 0,5 ml Phosphatpuffer versetzt. Nach jeder Zugabe wurde das Reagenzglas in einem Mixer durchgeschüttelt und anschließend der gesamte Ansatz auf Minimalagarplatten verteilt.

2.3.4. Wachstum und Auswertung

Nach dem Erkalten bzw. dem Erstarren der Topagarschicht wurden die Platten 72 Stunden bei 37° C im dunklen Brutschrank inkubiert. Nach 72 Stunden konnten die angewachsenen His^+ Kolonien dann automatisch mit einem Biotran II Counter (Biotronic) oder per Hand ausgezählt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse stellen jeweils einen repräsentativen Versuch aus einer Serie von mindestens 3 Einzelversuchen dar. Die Einzeldaten geben die Mittelwerte von 3 Platten pro Konzentration wieder. Die Standardabweichung wurde als mittlerer Fehler der Einzelmessung errechnet (68% Vertrauensbereich).

AMES-TEST mit Salmonella typhimurium

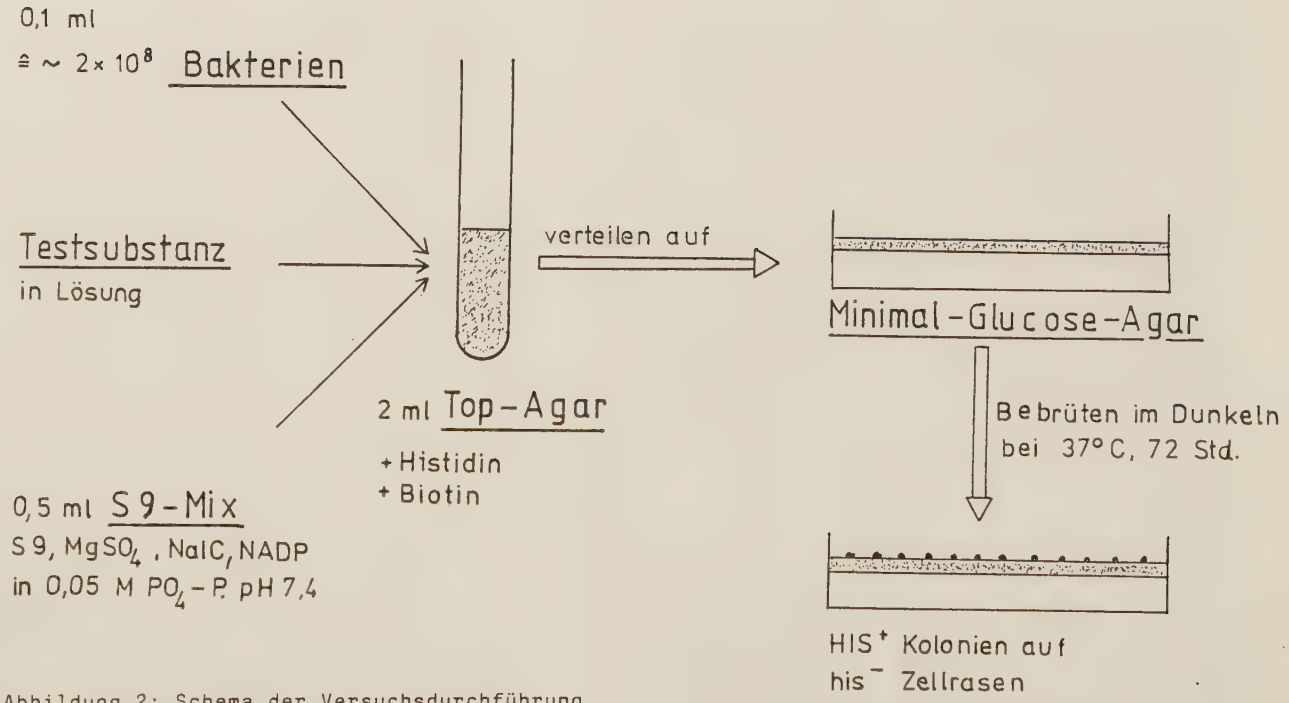


Abbildung 2: Schema der Versuchsdurchführung, dargestellt an einem Ansatz

2.4. Testsubstanzen

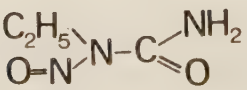
Die Auswahl der Testsubstanzen erfolgte nach zwei Kriterien. Zum einen sollte untersucht werden, ob der Nachweis einer mutagenen Wirkung von indirekt wirksamen chemischen Substanzen und eine Beeinflussung der direkten mutagenen Wirkung von Testsubstanzen durch eine exogene metabolische Komponente auch im Testsystem von Chlamydomonas reinhardii möglich ist. Hierzu wurde eine Anzahl bekannter Mutagene, die in anderen Testsystemen als Positivkontrollen Verwendung finden, geprüft. Ein Vergleich mit Literaturdaten die in anderen Testsystemen mit diesen Substanzen ermittelt wurden, sollte eine Bewertung der im Algensystem beobachteten Ergebnisse dienen.
Zum anderen sollten Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von zum Teil noch nicht untersuchten Chemikalien im Salmonella/Mikrosomen - und im Chlamydomonas/Mikrosomen - Testsystem einen direkten Vergleich der in diesen beiden Testsystemen erzielten Ergebnisse erbringen. Naturstoffe, die in pharmazeutisch genutzten Heilpflanzen gebildet werden, wurden zu diesem Zwecke ausgewählt. Ein Untersuchung dieser Substanzen erschien deshalb sinnvoll, weil Pflanzenextrakte in der Humantherapie in zunehmenden Maße Einsatz finden, obwohl es bisher nur sehr wenig Informationen über ein potentielles gesundheitliches Risiko dieser Agentien gibt.

2.4.1 Alkylierende Agentien

Die zunehmende Fülle von Befunden aus dem Bereich der Mutagenese-Grundlagenforschung, hat sehr bald dazu geführt, die biochemischen Wirkungsmechanismen chemischer Mutagene als Leitkriterien für die Zuordnung zu bestimmten Mutagengruppen zu verbinden (Gebhart 1977). Wegen ihrer mutagenen Wirkung werden Alkylantien in der Mutagenitätsforschung als Eich-

substanzen zur Erprobung neu entwickelter Testsysteme verwendet und finden zum Teil als Positivkontrollen Einsatz in etablierten Testsystemen.
Von ihrer chemischen Struktur her ist die Substanzgruppe der alkylierenden Agentien heterogen. Sie produzieren unter physiologischen Bedingungen hochreaktive, positiv geladene Ionen. Diese können mit allen elektronenreichen Strukturen der Zelle reagieren. Die biologischen Effekte dieses Alkylierungsmechanismus durch nukleophile Substitution, die in diesem Zusammenhang besonders interessieren, sind genotoxische Wirkungen auf die DNA und auf Proteine. Alkylierende Substanzen sind auf ihre Reaktionsmechanismen und deren Korrelation mit biologischen Effekten bereits gut untersucht (Lawley 1974, Vogel et al 1982) und wurden bereits in Chlamydomonas reinhardii erfolgreich als Mutagene eingesetzt (Gillham 1965, Ranneberg et al 1968, Schimmer et al 1975, Hawks et al 1976).
Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten alkylierenden Verbindungen wurden bislang allerdings in vegetativen Kulturen von Chlamydomonas reinhardii noch nicht bzw. in einem Falle (Borrmann 1985) erst in jüngster Zeit eingesetzt.

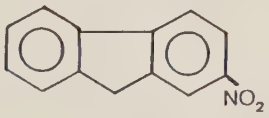
2.4.1.1. Ethylnitrosoharnstoff (ENU)



Die monofunktionelle alkylierende Verbindung ENU wird den

N-Nitrosoverbindungen zugerechnet, einer Gruppe von chemischen Agentien, unter deren Vertreter sich viele starke Mutagene und Kanzerogene befinden (Magison et al 1979). ENU ist sehr instabil und zerfällt in wässriger Lösung bei physiologischem pH unter Bildung des reaktiven Ethylkations. ENU zählt somit zu den direkt wirksamen Alkylantien. Auf seine Mutagenität und Kanzerogenität hin ist ENU gut untersucht (Vogel et al 1979, Theiß et al 1982). Publikationen über die Wirkung von ENU in Chlamydomonas unter Einbeziehung eines exogenen metabolisierenden Systems liegen bislang nicht vor.
ENU wurde von der Firma Sigma Chemie, Taufkirchen, bezogen. Da ENU sehr instabil ist, sind der von der Firma bezogenen Substanz 20% Gewichtsanteile 5% CH_3COOH als Stabilisator beigemengt. Die Lösung der Testsubstanz in sterilem Aceton p.a. erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn. Die Behandlung der Algen mit ENU erfolgte im Hellen über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37° C. Als exogenes metabolisierendes System wurde der S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, eingesetzt.

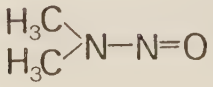
2.4.1.2. 2-Nitrofluoren (2 NF)



Die Substanz 2-Nitrofluoren gehört zur Gruppe der Nitroaromaten. Auf ihre mutagene und kanzerogene Wirkung hin sind diese Substanzen gut untersucht (Rosenkranz et al 1983).

Im Salmonellasystem konnte belegt werden, daß diese Agentien ungewöhnlich potente Mutagene sind (Rosenkranz 1982). Für 2-NF konnte zudem noch eine deutliche Steigerung der mutagenen Wirkung durch Zusatz eines exogenen metabolisierenden Systems (S9-Mix) nachgewiesen werden (Karpinsky et al 1980). Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung dieser Substanzen zu ultimaten elektrophilen Agentien spielen dabei bakterieneigene Nitroreduktaseenzyme (McCoy et al 1981). Das Vorhandensein solcher Enzyme, die zum Teil sehr substratspezifisch wirken können, konnte aber auch in Eukaryoten nachgewiesen werden (Salmeen et al 1983). Untersuchungen in eukaryotischen Systemen konnten vor kurzem einen zusätzlichen Aktivierungsmechanismus für diese Substanzen aufdecken (El-Bayoumy et al 1983). Die Aktivierung führt dabei zu biologisch aktiven Metaboliten, die als ein Resultat von Ringoxidationsprodukten entstanden sind. Publikationen über die Wirkungen von 2-NF in Chlamydomonas liegen bislang nicht vor.
2-NF wurde von der Firma EGA-Chemie, Steinheim, bezogen. Die Lösung in sterilem Aceton p.a. erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn. Die Behandlungsdauer betrug eine Stunde bei 37° C. Als Aktivierungssystem kam der S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, zum Einsatz.

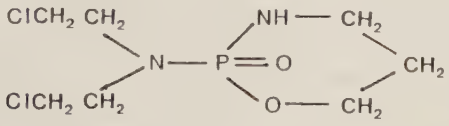
2.4.1.3. Dimethylnitrosamin (DMN)



Das stabile DMN gehört zu den mutagenen Substanzen, die nicht

per se, sondern erst nach Aktivierung mutagen wirken (Malling 1974). Die zunächst notwendige enzymatische Dealkylierung dieser Substanz kann im Gegensatz zu Testsystemen höherer Ordnung wie z.B. höhere Pflanzen (Veleminsky et al 1968, Arenaz et al 1978), Drosophila (Pasternak 1962) oder Säugerzellen (Mendoza-Figuera et al 1983),von Organismen mikrobieller Testsysteme nicht durchgeführt werden. Durch die Einführung einer exogenen metabolischen Komponente ins Testsystem kann jedoch eine Metabolisierung in vitro erfolgen. Eine enzymatische Aktivierung von DMN ist im Host-mediated Assay oder durch Zusatz von mikrosomalen Enzymen zum Testansatz möglich (Malling 1974). Auch durch ein enzymfreies Hydrolysierungsmedium nach Udenfriend kann eine Aktivierung von DMN in vitro erfolgen (Malling 1966). In vegetativen Kulturen von Chlamydomonas reinhardii wurde DMN bislang noch nicht auf seine genotoxischen Eigenschaften geprüft.
N,N-Dimethylnitrosamin wurde von der Firma EGA-Chemie,Steinheim, bezogen. Die Verdünnungsansätze für das DMN wurden mit sterilem DMSO unmittelbar vor Versuchsbeginn durchgeführt. Als Aktivierungssystem für DMN kam der S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, zur Anwendung.

2.4.1.4. Cyclophosphamid (N,N-bis (2-chlorethyl)-N, O-propylenphosphorsäurediamid)



Cyclophosphamid gehört zur Verbindungsklasse der N-Chlorethyl-

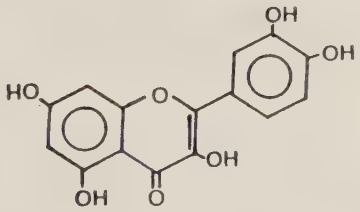
phosphorsäurediamide. Das bifunktionelle alkylierende Cyclophophamid vermag neben Monoalkylierungen von Nukleinsäure auch Cross-links in der DNA zu bilden. Wegen seiner hohen zytostatischen und immunsuppressiven Wirkung wird es weit verbreitet als Chemotherapeutikum eingesetzt (Sladek 1972), obwohl es im Bereich therapeutisch wirksamer Dosen auch cytotoxische Effekte zeigt. Cyclophosphamid liegt als inaktive Transportform vor, und wird erst durch eine Metabolisierung in seine alkylierende Wirkform überführt. Die Aktivierung kann ähnlich wie beim DMN auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, wobei je nach angewandter Methode unterschiedliche Abbauprodukte gebildet werden (Mayer et al 1976, Ellenberger et al 1977, Madle et al 1980). Per se ist Cyclophosphamid in Bakterien (Gatehouse 1978) und Hefen (Fleer et al 1982) nur sehr schwach wirksam. Nach metabolischer Aktivierung konnte jedoch eine hohe mutagene Wirkung von Cyclophosphamid in mikrobiellen Testsystemen festgestellt werden (Mayer et al 1976, Ellenberger et al 1977).

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde der S9-mix, ein mikrosomale Enzyme enthaltendes Leberhomogenat, als Aktivierungssystem verwendet. Nach Ellenberger (1977), nehmen dabei die Enzyme des sogenannten "mixed function-oxidases" Systems eine dominierende Funktion bei der Verstoffwechslung bzw. Aktivierung des Cyclophosphamid ein. Der erste Schritt bei dieser Art der Aktivierung des Cyclophosphamids ist eine C-4-Hydroxylierung, die zum instabilen Zwischenprodukt 4-Hydroxy-Cyclophosphamid führt. Dieser Metabolit oder sein tautomerer Aldehyd zerfallen spontan und bilden dabei die alkylierenden Spaltprodukte "Phosphoramidmustard" und Acrolein. Aus dem Phosphoramidmustard kann sich nun unter anderem entweder spontan oder auf enzymatischem Wege auch das sehr reaktive Nor-HN_2 (Nor-Nitrogen-Mustard) bilden (Hales 1982).
Cyclophosphamid wurde von der Firma Asta-Werke AG, Bielefeld, bezogen. Die Lösung der Testsubstanz erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn in sterilem DMSO. Als Aktivierungssystem kam der S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, zur Anwendung.

2.4.2 Naturstoffe

Höhere Pflanzen sind als Ausgangsprodukte für Arzneimittel und Rohextrakte, als Drogen und Frischpflanzen immer noch von erheblicher Bedeutung und gewinnen in jüngster Zeit immer mehr an Beachtung. Aber nicht alle Naturprodukte sind frei von unerwünschten Nebenwirkungen. So kennt man schon seit längerer Zeit genotoxisch wirkende Verbindungen, die von Natur aus in unserer Umwelt vorkommen und über eine Reaktion mit der DNA mutagene oder kanzerogene Wirkungen in den unterschiedlichsten Testsystemen hervorrufen (Schimmer 1978). Die Untersuchungen von vier sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in den Testsystemen von Salmonella und Chlamydomonas sollten einem Vergleich der beiden Testsysteme dienen und Hinweise für eine Risikoabschätzung dieser Substanzen liefern. Eingesetzt wurden die Verbindungen: Quercetin, ß-Asaron, Aristolochiasäuren und Bergapten.

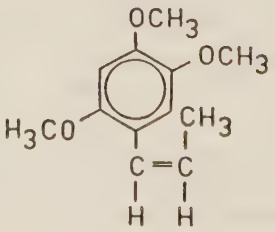
2.4.2.1. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon)



Über 1000 Flavonoide natürlichen Ursprungs konnten bereits beschrieben werden (Harborne et al 1975). Sie sind universell im Reich der Gefäßpflanzen verbreitet, und konnten in vielen pflanzlichen Nahrungsmitteln nachgewiesen werden (Herrmann 1976). Seit einiger Zeit wird den Flavonoiden aus wissenschaftlicher Sicht wieder mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Ihre mutagene

Wirkung in Bakterien (Hardigree et al 1978, Brown 1980) und kultivierten Säugerzellen (Carver et al 1983) lenkten das Interesse verstärkt auf diese Stoffgruppe. Bis heute konnte die Mutagenität von 28 Flavonoiden im Ames-Test nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß Quercetin das potenteste Mutagen dieser Gruppe ist. Zugabe eines metabolisierenden Systems zum Testansatz steigert dabei den mutagenen Effekt erheblich. Die Aktivierung von Quercetin zu einer stärker wirksamen mutagenen Substanz unbekannter Konstitution, wird dabei durch nicht induzierbare lösliche Enzyme bewirkt (MacGregor et al 1978). Untersuchungen zum Einfluß der Enzymkonzentration im metabolisierenden System auf die Mutagenität von Quercetin liegen bislang nicht vor. Ebenso wurde Quercetin im Testsystem von Chlamydomonas noch nicht untersucht.
Quercetin wurde von der Firma Carl Roth GmbH & Co,Karlsruhe, bezogen. Die Lösung der Testsubstanz erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn in sterilem DMSO. Als Aktivierungssystem kam der S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, zur Anwendung.

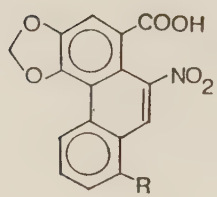
2.4.2.2. ß-Asaron (cis-1-propenyl 3,4,5,-trimethoxybenzol)

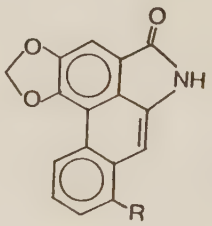


Der Kalmus (acorus calamus L), eine Sumpfpflanze, gehört zur Familie der Aronstabgewächse (Araceen) und kommt in Europa, Nordamerika und Asien vor. Man unterscheidet diploide

triploide und tetraploide Rassen, die eine unterschiedliche Zusammensetzung des ätherischen Öls aufweisen (Wulff 1954). Der wertbestimmende Bestandteil des Öls ist das ß-Asaron, das in wechselnden Mengen vorkommt. Der Anteil des ß-Asarons schwankt zwischen 0% und 96,5% im Öl und zwischen 0% und 8,3% in der Droge (Stahl 1981). Als Droge wird der getrocknete Wurzelstock oder das Öl verwendet. Die Kalmuswurzel ist ein ausgezeichnetes Bittermittel und findet Verwendung bei Magen- - und Verdauungsbeschwerden. Äußerlich werden Extrakte zur Mundspülung und als Badezusatz bei der Behandlung von Rheuma oder kindlicher Skrofulose empfohlen. Eine toxikologische Zweijahresstudie die mit unterschiedlich konzentriertem Kalmusöl an Ratten durchgeführt wurde, ergab eine kanzerogene Wirkung dieses Öls bei den Versuchstieren (Taylor et al 1967, Gross et al 1970). Das bei dieser Untersuchung verwendete Kalmusöl wurde aus der indischen Kalmuspflanze gewonnen, die den höchsten ß-Asarongehalt besitzt. Vom Gesetzgeber wurde daraufhin die Verwendung von Kalmus in den USA verboten.
In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, daß die Entstehung von Zwölffingerdarmtumoren auf ß-Asaron zurückzuführen ist (Habermann 1971). Für die in der BRD käuflichen Kalmusdrogen werden vorwiegend Kalmusrhizome aus Osteuropa verwendet. Deren ß-Asarongehalt im ätherischen Öl liegt zwischen 5% und 10% (Stahl 1981). Untersuchungen zur mutagenen Wirkung dieser Substanz lagen zu Beginn dieser Arbeit nicht vor.
ß-Asaron wurde von der Firma EGA-Chemie, Steinheim, bezogen. Die Verdünnungsansätze erfolgten unmittelbar vor Versuchsbeginn in sterilem DMSO. Als Aktivierungssystem kam der S9, der von unterschiedlich vorbehandelten Ratten stammte zur Anwendung.

2.4.2.3. Aristolochiasäuren (8-Methoxy-6-nitrophenanthro (3,4-d) 1,3-dioxol-5-Carbons





Aristolochiasäure-I: R= -OCH_3
Aristolochiasäure II:R= -H

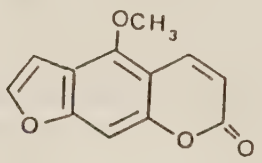
Aristolactam I: R= -OCH_3

Viele Pflanzen, die pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe enthalten sind schon seit vielen hunderten von Jahren bekannt. Dies trifft auch auf Aristolochia Clematitis L zu, deren Blatt-und Wurzelextrakte schon von den alten Ägyptern gegen Schlangenbisse eingesetzt wurden. Bis vor kurzem wurden Aristolochiaextrakte, deren pharmakologischer wirksamer Inhaltsstoff Aristolochiasäure ist, bei der Therapie von Arthritis, Gicht und eiternden Wunden in Deutschland eingesetzt. Eine antibakterielle und fungizide Wirkung von Aristolochiasäure ist bekannt. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß Aristolochiasäure die Phagozytose steigert und eines Einfluß auf den körpereigenen Abwehrmechanismus bei Infektionen besitzt (Möse 1963, Bartfeld 1977, Möse et al 1980). Die in der Therapie eingesetzte Aristolochiasäure kommt als ein Gemisch chemisch sehr ähnlich gebauter Komponenten, von denen Aristolochiasäure I und Aristolochiasäure II die Hauptbestandteile sind,in einigen Aristolochiaceen vor (Schunack et al 1967). Ebenso konnten Aristolactame in vielen Spezies dieser Pflanzenfamilie nachgewiesen werden (Mix et al 1982).
Im Jahre 1981 erfolgte vom deutschen Bundesgesundheitsamt

der Widerruf der Zulassung jener Pharmazeutika, in denen Aristolochiasäure enthalten war (Bundesgesundheitsamt 1981). Auslösend für diese Entscheidung war der Nachweis der kanzerogenen Eigenschaft dieser Substanz (Mengs et al 1982, Mengs 1983).
Aristolochiasäuren sind aromatische Verbindungen mit stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen und sind ausgezeichnet durch ein Phenanthrengrundgerüst. Untersuchungen zur Mutagenität von Nitroaromaten standen in jüngster Zeit verstärkt im Mittelpunkt des Interesses und konnten eine unerwartet hohe mutagene Potenz dieser Substanzen in bakteriellen Testsystemen belegen (Tokiwa et al 1983). Im eukaryotischen System von Saccharomyces cerevisiae konnte dagegen nur für eine geringe Anzahl von Nitroaromaten eine genotoxische Wirkung nachgewiesen werden (McCoy et al 1983). Eine zentrale Rolle im biologischen Wirkungsmechanismus der Nitroaromaten, der schließlich zum ultimativ mutagen wirkenden Agents führt, kommt dabei der Reduktion der Nitrogruppe zu (Rosenkranz et al 1983). Publikationen über die mutagene Wirkung von Aristolochiasäure lagen zu Beginn der Arbeit nicht vor.

Aristolochiasäure wurde von der Firma EGA-Chemie, Steinheim, bezogen und ist eine Mischung verschiedener Aristolochiasäuren (Hauptbestandteil: Aristolochiasäure I und Aristolochiasäure II). Die Reinsubstanzen Aristolochiasäure I und Aristolochiasäure II wurden freundlicherweise von Dr. W. Lang (Dr. Maddaus & Co, Köln) zur Verfügung gestellt. Aristolactam I wurde von Dr. Schürger, Institut für angewandte Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, synthetisiert. Die Testsubstanzen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in sterilem DMSO gelöst. Es wurde der S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, verwendet.

2.4.2.4. Bergapten (5 MOP)



Bergapten wurde als Vertreter einer weiteren Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, den Furocumarinen, in die Untersuchungen mit einbezogen. Furocumarine treten bevorzugt in bestimmten Pflanzenfamilien,wie z.B. in den Apiaceae und Rutaceae auf, und sind häufig in Arzneimittelspezialitäten zu finden (Schimmer 1978, Schimmer et al 1980). Als Reinsubstanzen werden 8 MOP und neuerdings auch 5 MOP bei der Behandlung verschiedener Hautkrankheiten empfohlen und eingesetzt. So wird seit 1974 die Photochemotherapie (PUVA),d.h. die Applikation eines Furocumarins und eine sich anschließende Bestrahlung mit UV-A (langwelliges UV-Licht, Wellenbereich 320 - 440 nm),mit ausgezeichnetem Erfolg zur Behandlung der Psoriasis eingesetzt (Weber 1978).

Im Dunkeln bilden Furocumarine schwache Komplexe mit der Desoxyribonucleinsäure. Die Interkalationskomplexe - - Furocumarine werden dabei zwischen den DNA-Basen eingeschoben - können bei einer Bestrahlung mit UV-A im Zuge einer Photoreaktion kovalente Verbindungen mit der DNA eingehen (Pill-Soon et al 1979).

Untersuchungen zur direkten Mutagenität von 5 MOP im Dunkeln konnten im Testsystem von Salmonella keine mutagene Wirkung dieser Testsubstanz belegen (Quinto et al 1984). Es ist aber bekannt, daß eine Anzahl von Furocumarinen nach metabolischer Aktivierung mutagen in Salmonella wirken (Tamaro et al 1981). Untersuchungen zur Mutagenität von 5 MOP im Dunkeln unter

Einbeziehung eines exogenen metabolisierenden Systems wurden deshalb sowohl in den Testsystemen von Salmonella als auch von Chlamydomonas durchgeführt.

Bestrahlt man Furocumarine mit UV-A,wirken viele dieser Substanzen stark mutagen in Chlamydomonas (Schimmer 1981) und Saccharomyces cerevisiae (Pill-Soon et al 1979). In E.coli Zellen kann man durch diese Behandlung mutagene und vor allem letale Effekte erzielen; eine bakterizide Wirkung einer PUVA-Behandlung konnte auch bei B. subtilis und Salmonella typhimurium beobachtet werden (Pill-Soon et al 1979). Im Testsystem von Chlamydomonas ist eine starke mutagene Wirkung von 5 MOP unter diesen Testbedingungen bekannt (Schimmer 1981). Untersuchungen zur Mutagenität von 5 MOP + UV-A unter Einbeziehung eines metabolisierenden exogenen Systems liegen bislang weder in Chlamydomonas noch in Salmonella vor.

5 MOP wurde von der Firma Senn Chemicals, Dielsdorf (Schweiz), bezogen. Die Lösung der Testsubstanz erfolgte stets unmittelbar vor Versuchsbeginn in sterilem Aceton p.a.. Als metabolisierendes System wurde der S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Ratten stammte, verwendet.

Für die Bestrahlung wurden Röhren der Firma Phillips benutzt. Sie trugen die Bezeichnung TL 40 W/08 RS mit dem Emissionsmaximum bei 366 nm und einer Bandbreite von 60 nm. Die Messung der Raumbestrahlungsstärke erfolgte nach Hartmann (1978). Die Raumbestrahlung betrug bei dem gewählten Abstand von 25 cm zwischen den UV-A Röhren und der Suspensionsoberfläche etwa 2 Wm^{-2}.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen von alkylierenden Agentien in Chlamydomonas

3.1.1. Einfluß von ENU auf die relative Überlebens- und Reversionsrate

ENU wurde in den Konzentrationen 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml ausgetestet. Auf Grund der verwendeten ENU Charge, die 20 Gewichtsprozent eines Stabilisators enthielt, wurden für die Stammlösung 25% mehr ENU eingewogen. Es wurde das übliche Testschema mit einer Stunde Inkubationszeit bei 37° C vor dem Ausplattieren der Testorganismen angewandt.

Über die Wirkung von ENU im Testsystem von Chlamydomonas gibt Abbildung 3 und die Tabellen 1+2 Aufschluß. Sowohl mit der arg 1^- - als auch mit der sd-3-18 - Mutante konnte eine mutagene Wirkung von ENU ohne Metabolisierung nachgewiesen werden. ENU zeigt eine dosisabhängige mutagene Wirkung im ausgetesteten Konzentrationsbereich. Der Zusatz eines exogenen metabolisierenden Systems zum Testansatz wirkt sich nur durch eine geringe Veränderung der Reversionsraten aus. Die Unterschiede zu den Werten, die ohne metabolische Komponente im Testansatz erhalten wurden, sind auf Grund statistischer Berechnungen als nicht signifikant anzusehen. Die arg 1^- Mutante erwies sich dabei, betrachtet man den Faktor der Reversionsratenerhöhung als Maß für die Empfindlichkeit eines Systems, im Vergleich zur sd-3-18 Mutante als der sensiblere Testorganismus. Vergleicht man die Reversionsraten der dargestellten Versuche miteinander, so fällt auf, daß sich die entsprechenden Ergebnisse der einzelnen Versuche zum Teil in den absoluten Zahlenwerten unterscheiden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die mutagene Wirkung

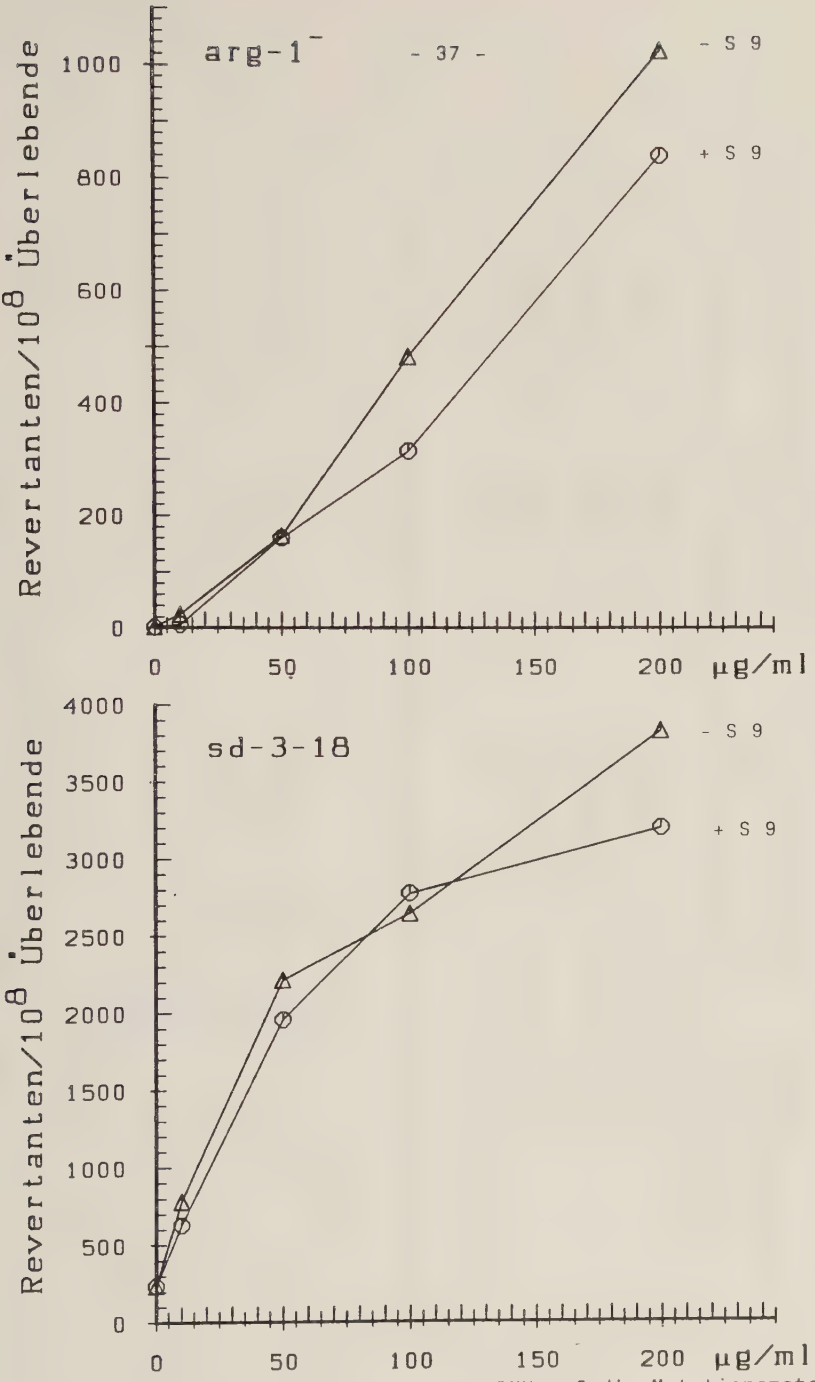


Abbildung 3: Versuch 1 :Einfluß von ENU auf die Mutationsrate in Chlamydomonas reinhardii

	c [µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1⁻	0	100,0± 9,5		1,8± 1,8	
	10	104,3± 3,7	92,7±12,7	13,9± 5,4	11,7± 3,9
	50	88,6± 7,9	95,3± 4,7	172,1± 21,3	123,4± 15,8
	100	88,0± 5,6	91,7± 8,2	348,1± 18,7	276,3± 15,3
	200	89,3± 9,0	101,0± 6,9	596,7± 39,5	546,0± 40,7
sd-3-18	0	100,0±17,1		271,6± 24,8	
	10	109,4±13,1	99,4±16,3	552,1± 33,1	583,6± 43,2
	50	101,3±12,2	104,3±14,7	2165,0±131,2	1996,2±151,3
	100	92,7±12,2	93,7± 8,0	3053,0±197,7	2838,2±166,8
	200	90,7±11,2	93,5± 7,8	3885,0±212,8	3231,5±140,7

Tabelle 1: Versuch 2

Einfluß von ENU auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

	c [µg/ml]	rel.ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1⁻	0	100,0±8,5		1,7± 4,5	
	10	94,1±6,5	93,3±9,2	25,9± 6,1	8,6± 4,5
	50	97,2±3,5	82,7±9,4	177,6± 12,5	179,1± 16,0
	100	80,3±7,0	86,7±5,8	541,3± 37,6	273,4± 23,3
	200	77,6±5,2	85,5±7,2	1121,3± 60,9	780,5± 42,6
sd-3-18	0	100,0±8,5		268,6± 18,7	
	10	100,7±9,0	91,3±8,0	843,3± 54,0	695,5± 39,5
	50	90,5±7,2	93,2±7,2	2521,8±148,0	2149,2± 89,9
	100	87,6±4,4	79,9±6,0	3030,6±135,1	3073,1±114,5
	200	81,6±7,1	75,8±7,7	4108,1±193,7	3327,1±157,7

Tabelle 2: Versuch 3

Einfluß von ENU auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

einer Testsubstanz in Chlamydomonas stark von der Ausgangszellzahl abhängig ist (Schimmer 1981) und eine unterschiedliche Ausgangszellzahl bei den einzelnen Versuchen gegeben war.
Eine toxische Wirkung von ENU im ausgetesteten Konzentrationsbereich konnte, wie an Hand der relativen Überlebensraten in den Tabellen 2+3 ersichtlich, nicht festgestellt werden.

3.1.2. Einfluß von 2-NF auf die relative Überlebens- und Reversionsrate

2-NF wurde in den Konzentrationen 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml Inkubationsansatz ausgetestet. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie üblich mit einer Stunde Behandlungsdauer bei 37° C im Wasserbad. Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von 2-NF konnten, wie Abbildung 4 und die Tabellen 3+4 belegen, eine direkte mutagene Wirkung der Testsubstanz aufzeigen. Die Kurve für die Reversionsrate steigt dabei in Abhängigkeit von der 2-NF Konzentration an. Durch eine exogene metabolische Aktivierung kann die mutagene Wirkung von 2-NF noch gesteigert werden. Sowohl im System der arg 1^- Mutante als auch der sd-3-18 Mutante wurde dieser Effekt übereinstimmend beobachtet. Das System der arg 1^- Mutante erwies sich dabei, nimmt man den Faktor der Erhöhung der Reversionsrate als Maßstab, als das empfindlichere System. Ebenso wie bei den Untersuchungen zur Mutagenität von ENU ist aus den dargestellten Daten ersichtlich, daß die absoluten Werte der in den einzelnen Versuchen gemessenen Reversionsraten von der Ausgangszellzahl abhängig sind und sich deshalb nicht völlig decken.
Der Einfluß von 2-NF auf die relative Überlebensrate ist, wie aus den Tabellen 2 + 4 ersichtlich, per se relativ gering. Eine etwas höhere Toxizität der Testsubstanz kann in den Versuchen mit S9-Mix Zugabe festgestellt werden.

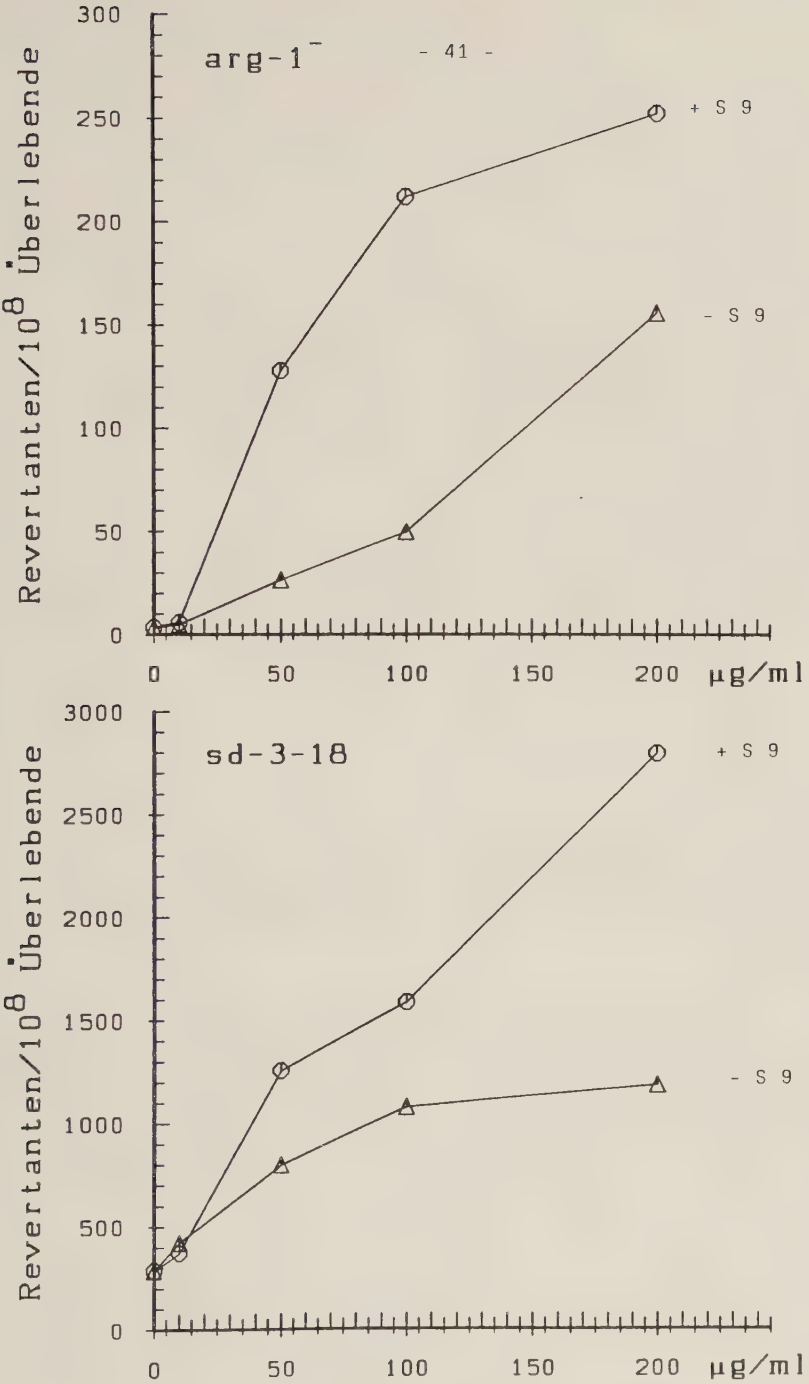


Abbildung 4: Versuch 1: Einfluß von 2-NF auf die Mutationsrate in Chlamydomonas reinhardii

	c [µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1⁻	0	100,0±10,8		1,6± 1,6	
	10	100,9± 6,4	100,9±9,6	6,5± 3,4	4,8± 2,3
	50	91,1± 4,7	97,3±7,2	24,6± 5,6	102,9± 9,1 *
	100	95,6± 6,7	83,5±8,4	38,6± 6,4	159,6±12,9 *
	200	93,7± 7,5	76,2±8,4	121,0±16,4	276,8±20,6 *
sd-3-18	0	100,0± 7,6		202,6±15,2	
	10	104,9± 2,6	104,3±3,9	275,8±12,5	263,5±20,5
	50	99,8± 4,3	100,7±5,4	576,8±25,2	771,5±24,7 *
	100	91,1± 5,7	86,8±6,9	914,2±36,7	1103,3±45,8 *
	200	88,7±10,2	85,3±3,0	1070,1±60,0	1901,7±87,2 *

Tabelle 3: Versuch 2

Einfluß von 2-NF auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

* statistisch signifikante Unterschiede der Mutationsraten

	c [µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1⁻	0	100,0±10,8		1,9± 1,8	
	10	105,9± 8,0	88,4± 8,0	3,5± 2,5	6,3± 4,4
	50	91,8± 8,1	83,2± 8,4	24,3± 5,3	122,7± 15,0*
	100	68,7± 5,2	64,0± 5,7	45,8± 11,9	162,2± 12,2*
	200	68,3±10,5	64,7± 9,6	173,9± 21,5	260,8± 32,8*
sd-3-18	0	100,0± 9,7		273,5± 23,4	
	10	112,4±15,3	109,5±17,0	351,4± 29,1	327,6± 35,7
	50	100,8± 9,2	101,8±13,5	723,7± 43,1	961,4± 61,4*
	100	87,6±12,3	82,5±11,2	1057,5± 72,3	1378,9± 88,5*
	200	87,6±15,2	78,6±11,9	1389,9±109,0	2593,5±221,1*

Tabelle 4: Versuch 3

Einfluß von 2-NF auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

* statistisch signifikante Unterschiede der Mutationsraten

3.1.3. Einfluß von DMN auf die relative Überlebens- und Reversionsrate

DMN wurde in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml Inkubationsansatz ausgetestet. Wie aus den Tabellen 5 und 6 ersichtlich, kann eine toxische Wirkung von DMN in den ausgetesteten Konzentrationsbereichen sowohl für die arg 1^- - als auch für die sd-3-18 - Mutante von Chlamydomonas ausgeschlossen werden.
Der Einfluß von DMN auf die Reversionsrate von Chlamydomonas ist der Abbildung 5 und den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen. In Übereinstimmung mit den meisten anderen mikrobiellen Testsystemen können mutagene Effekte von DMN nur in den Versuchsansätzen, die eine exogene metabolisierende Komponente enthielten, beobachtet werden. Sowohl im System der arg 1^- - als auch der sd-3-18 - Mutante waren diese Effekte nachweisbar. Dabei erwies sich, nimmt man den Faktor der Reversionsratenerhöhung als Maß für die Empfindlichkeit eines Systems, die arg 1^- - Mutante im Vergleich zur sd-3-18 - Mutante als der sensiblere Testorganismus. In Abhänigkeit von der DMN-Konzentration nimmt bei Chlamydomonas die Anzahl der Revertanten/10^8 Überlebende im gesamten ausgetesteten Konzentrationsbereich zu. Ohne den Zusatz des metabolisierenden Systems zeigt DMN in den beiden untersuchten Mutanten von Chlamydomonas keine mutagene Wirkung. Abweichungen der gemessenen Reversionsraten in den Versuchen ohne exogene Metabolisierung von der Kontrolle, liegen im Bereich der normalen Schwankungsbreite der entsprechenden Spontanraten.

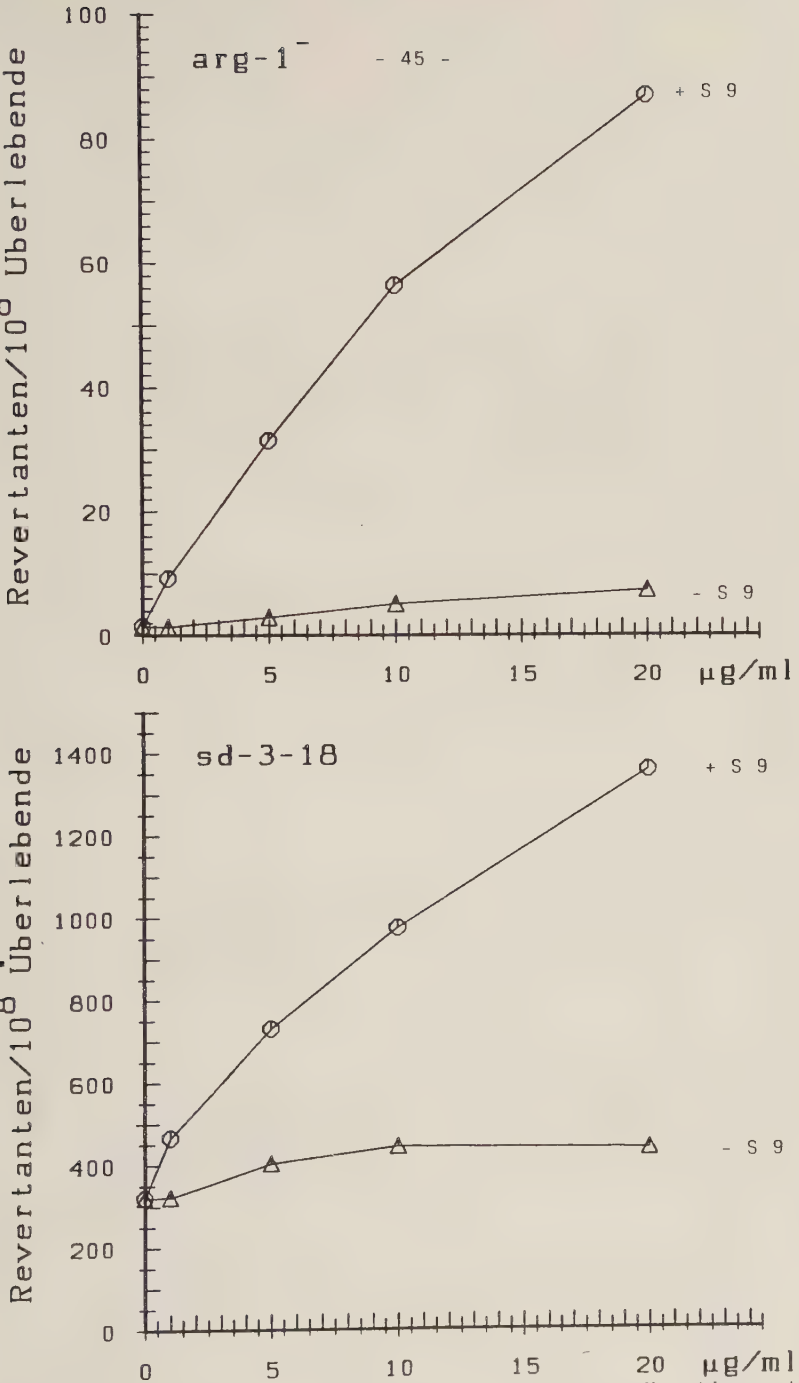


Abbildung 5: Versuch 1: Einfluß von DMN auf die Mutationsrate in Chlamydomonas reinhardii

	c[µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1-	0	100,0± 7,5		3,8± 2,1	
	10	93,0± 5,2	96,4± 5,2	1,9± 1,7	13,9± 6,2
	50	98,2± 7,2	93,8± 6,1	3,9± 2,2	49,5±10,0 *
	100	91,4± 4,7	95,2± 4,3	8,4± 5,9	65,0±11,5 *
	200	94,1± 5,5	94,5± 7,7	6,0± 2,9	90,0± 6,5 *
sd-3-18	0	100,0±20,8		397,8±42,5	
	10	102,4±12,0	98,9±13,1	409,8±34,9	477,7±33,0
	50	88,5± 7,4	91,8± 4,7	397,0±30,4	744,0±46,9 *
	100	97,8±16,9	84,8± 9,0	449,4±35,5	1090,6±87,2 *
	200	89,6± 4,1	94,7± 5,2	424,0±17,5	1222,7±57,9 *

Tabelle 5: Versuch 2

Einfluß von DMN auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

* statistisch signifikante Unterschiede der Mutationsraten

	c [µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1⁻	0	100,0± 9,7		4,2± 2,9	
	10	101,5±11,0	96,8± 9,8	2,2± 2,1	11,3± 4,6
	50	98,0±11,9	103,5± 4,0	4,5± 2,9	55,0± 7,7 *
	100	102,4± 6,8	103,5± 3,6	4,3± 2,8	80,4± 8,3 *
	200	103,3±10,5	88,6±11,9	2,1± 9,9	143,3±14,0 *
sd-3-18	0	100,0±12,7		162,0±18,7	
	10	91,9±13,5	97,7± 4,0	208,7±19,3	396,7±33,0 *
	50	89,5± 7,5	90,7± 9,1	179,6±13,8	961,2±52,5 *
	100	86,9±10,8	86,2±10,6	231,2±14,3	1133,8±88,8 *
	200	87,2±12,2	87,4±10,6	210,8±24,0	1186,8±72,6 *

Tabelle 6: Versuch 3

Einfluß von DMN auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

* statistisch signifikante Unterschiede der Mutationsraten

3.1.4. Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Überlebens- und Reversionsrate

Die Testsubstanz wurde in den Konzentrationen 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml ausgetestet. Da aber nach einer Inkubationszeit von einer Stunde keine eindeutigen Ergebnisse erzielt wurden, wurde die Behandlungsdauer auf 24 Stunden ausgedehnt.
Untersuchungen zur Toxizität sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen. Ohne metabolisierende Komponente im Testsystem wirkt Cyclophosphamid in Chlamydomonas nicht toxisch. Nach metabolischer Aktivierung jedoch konnte eine toxische Wirkung der Testsubstanz festgestellt werden. Die Unterschiede der relativen Überlebensraten zwischen der höchsten bzw. der niedrigsten getesteten Konzentration an Cyclophosphamid sind dabei auffallend gering.
Versuchsergebnisse zur Mutagenität von Cyclophosphamid in Chlamydomonas sind der Abbildung 6 und 7 und den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen. Ohne exogene Metabolisierung wirkt Cyclophosphamid in Chlamydomonas nicht mutagen. Nach metabolischer Aktivierung ist jedoch eine,wenn auch relativ schwache, mutagene Wirkung von Cyclophosphamid in den beiden untersuchten Mutantenstämmen von Chlamydomonas nachweisbar. Dabei erwies sich wiederum, betrachtet man den Faktor der Reversionsratenerhöhung als Maß für die Empfindlichkeit des Systems, die arg 1^- - Mutante als der sensiblere Testorganismus.
In einem weiteren Versuchsblock sollte der Einfluß der Enzymkonzentration im verwendeten S9-Mix auf die mutagene Wirkung von Cyclophosphamid untersucht werden. Die Konzentrationen an Testsubstanz betrug bei all diesen Versuchen jeweils 100 µg/ml Inkubationsansatz. Variiert wurde der Proteingehalt im S9-Mix. Die ausgetesteten Konzentrationen betrugen 1,24; 2,5; 7,5 und 10 mg Protein pro ml S9-Mix. Ebenso wie

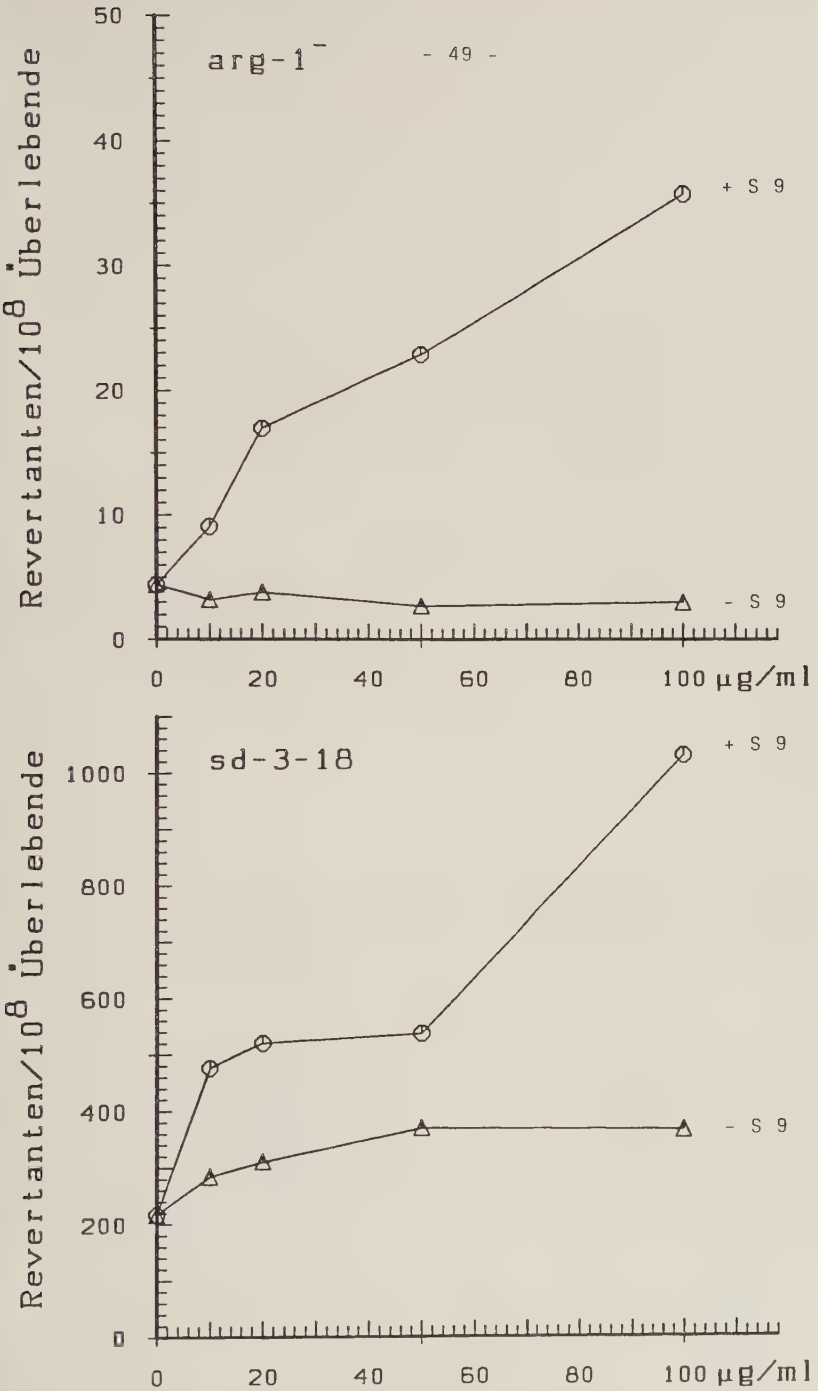


Abbildung 6: Versuch 1: Einfluß von Cyclophosphamid auf die Mutationsrate in Chlamydomonas reinhardii
Behandlungszeit: 24 Stunden

	c [µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA		
		-S9	+S9	-S9	+S9	
arg 1⁻	0	100,0± 7,5		1,8± 1,6		
	10	95,0± 6,9	64,1±8,2	3,9± 2,2	5,8± 3,3	
	20	84,4±10,2	58,9±3,4	2,1± 1,8	9,4± 6,3	
	50	88,2± 5,8	58,0±3,0	4,2± 2,4	19,4± 7,3	*
	100	88,9± 9,0	51,4±4,6	4,2± 2,4	36,6± 10,4	*
sd-3-18	0	100,0± 9,6		309,5±16,7		
	10	94,3±10,2	37,9±5,9	338,7±30,0	659,1± 64,8	*
	20	99,4± 6,1	33,6±4,5	350,4±15,4	808,0± 53,2	*
	50	102,5±16,3	31,4±4,6	306,7±27,3	1064,8± 72,1	*
	100	94,5±12,9	25,6±5,1	332,7±29,9	1337,7±134,5	*

Tabelle 7: Versuch 2
Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii ; Behandlungszeit: 24 Stunden
* statistisch signifikante Unterschiede der Mutationsraten

	c [µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1⁻	0	100,0± 6,9		2,3± 1,6	
	10	82,0±10,0	48,3± 6,0	2,8± 2,7	9,4± 6,1
	20	83,2± 5,2	38,7± 9,0	2,7± 2,7	17,4± 8,6 *
	50	86,5± 7,2	36,3± 8,0	2,6± 2,6	24,6± 13,2 *
	100	80,1±11,0	29,2± 8,3	2,8± 2,8	46,6± 16,3 *
sd-3-18	0	100,0±10,6		338,2±23,4	
	10	92,5±14,0	39,2± 8,2	382,6±42,8	673,4± 68,4 *
	20	90,1±13,0	36,3±12,2	392,9±34,3	845,1±127,6 *
	50	98,7±16,1	28,9± 9,8	314,0±34,7	1013,9±149,3 *
	100	95,0±13,0	26,7± 8,3	306,8±25,3	1250,0±175,5 *

Tabelle 8: Versuch 3

Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii; Behandlungszeit: 24 Stunden

* statistisch signifikante Unterschiede der Mutationsraten

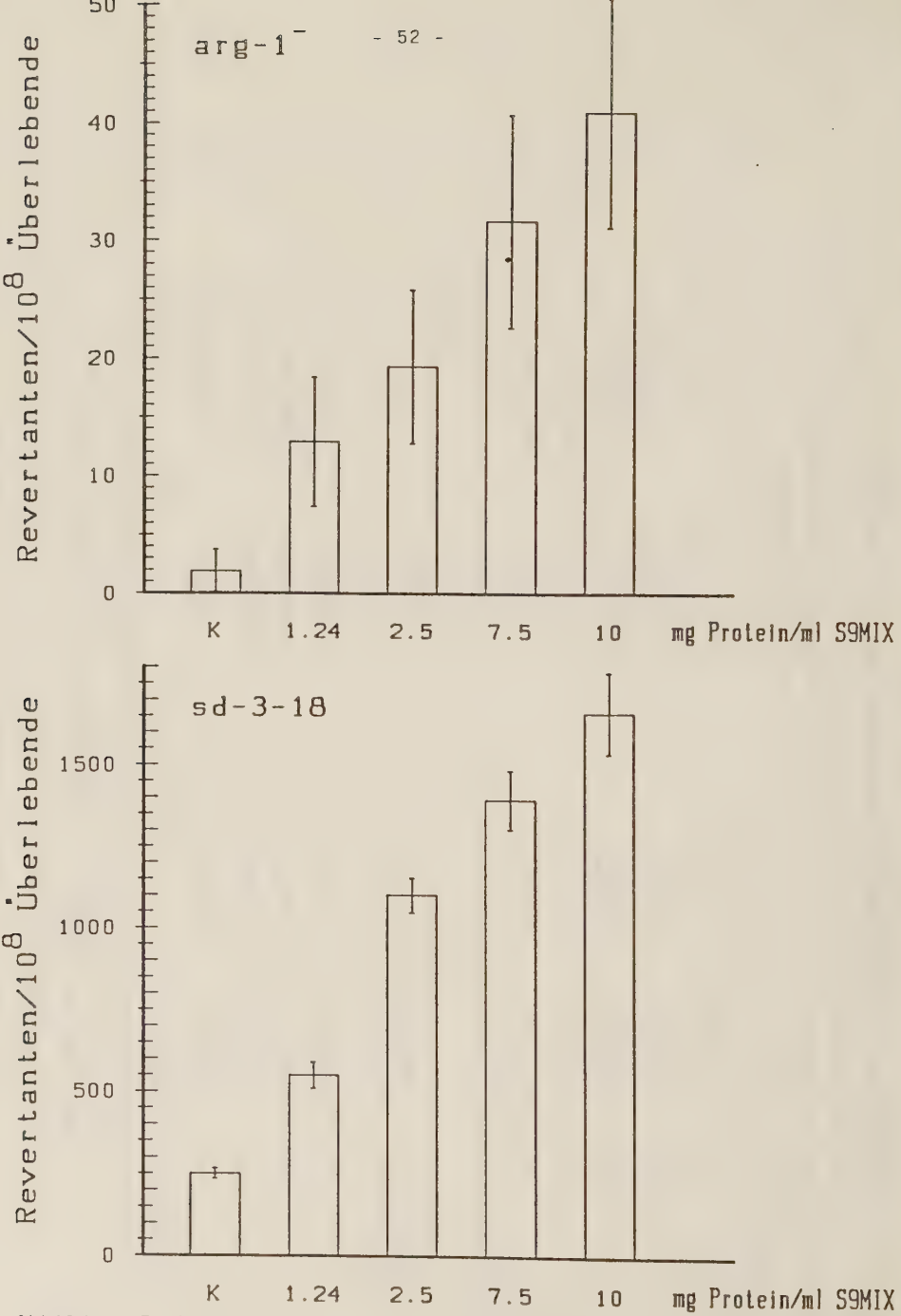


Abbildung 7: Einfluß von 100 µg/ml Cyclophosphamid auf die Mutationsrate in Chlamydomonas reinhardii in Abhängigkeit von der im S 9-Mix enthaltenen Proteinkonzentration (Versuch 1)
Behandlungszeit: 24 Stunden

im ersten Versuchsabschnitt zur Mutagenität von Cyclophosphamid wurde auch hier 24 Stunden inkubiert. Abbildung 7 macht deutlich, daß die mutagene Wirkung von Cyclophosphamid in Chlamydomonas von der für die Aktivierung eingesetzten Enzymmenge abhängig ist. Mit steigendem Proteingehalt im S9-Mix nimmt auch die Fähigkeit von Cyclophosphamid im Testsystem von Chlamydomonas mutagen zu wirken zu.Alle durchgeführten Versuche bestätigen das in Abb.7 dargestellte Ergebnis. Auf eine Darstellung der Versuche 2 und 3 wurde deshalb verzichtet.

3.2. Vergleichende Untersuchungen zur Mutagenität ausgewählter Naturstoffe in den Testsystemen Chlamydomonas und Salmonella

3.2.1. Untersuchungen zur Mutagenität von Quercetin

Mutagenitätsuntersuchungen an Chlamydomonas reinhardii

Quercetin wurde in den Konzentrationen 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml Inkubationsansatz ausgetestet. Wie Tabelle 9 zeigt, erbrachten Untersuchungen zur mutagenen Aktivität von Quercetin im Algensystem nach einstündiger Behandlung der Testorganismen nur negative Befunde. Weder mit der arg 1^- - noch mit der sd-3-18 - Mutante konnte eine direkte mutagene Wirkung der Testsubstanz in Chlamydomonas nachgewiesen werden. Auch der Zusatz eines exogenen metabolisierenden Systems (Standard S9-Mix mit einem Proteingehalt von 2,5 mg Protein pro ml S9) bewirkte keine Induktion von Revertanten. Toxische Effekte konnten ebenso ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration auf 7,5 mg Protein pro ml S9-Mix hatte ebenso keine mutagene Wirkung der Testsubstanz zur Folge. Ebenso führte eine Erhöhung der

	c [µg/ml]	-S9	+2,5mg Protein/ml	+7mg Protein/ml	-S9	+2,5mg Protein/ml	+7mg Protein/ml
arg 1-	0	100,0± 5,9		100,0± 6,5	1,8± 1,5		5,6± 4,0
	10	97,9± 8,2	101,1±3,3	87,9±12,2	3,6± 3,6	1,7± 1,5	4,3± 2,8
	50	95,5± 9,5	100,0±4,0	85,9±12,9	1,8± 1,5	3,6± 2,0	2,1± 2,2
	100	98,2± 4,7	99,2±3,7	76,0± 9,9	3,6± 2,0	1,8± 1,5	2,4± 2,5
	200	96,8± 7,3	97,8±6,2	87,4±11,9	1,8± 1,5	5,5± 3,6	4,4± 2,8
sd-3-18	0	100,0±10,4		100,0± 8,8	270,9±26,0		311,6±23,9
	10	96,1± 5,6	99,3±8,0	85,9±14,2	285,2±20,1	251,6±25,5	354,5±28,1
	50	102,5±12,2	101,7±7,9	89,4±11,2	245,2±20,5	245,6±18,5	328,7±30,2
	100	97,5± 6,2	93,2±6,9	95,2± 9,3	276,0±18,9	273,3±21,8	337,3±23,8
	200	90,3± 4,8	91,2±7,2	82,9±10,7	291,0±35,3	291,5±21,2	335,5±33,6

Tabelle 9: Einfluß von Quercetin auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii
Behandlungszeit 1 Stunde

	c[µg/ml]	rel. ÜR + SA in %		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1⁻	0	100,0±10,2		2,3± 2,4	
	10	99,2±14,3	94,7±11,8	5,0± 3,3	2,5± 2,5
	50	95,7± 9,3	78,1±16,6	2,4± 2,5	3,0± 3,1
	100	84,4±10,2	71,4± 5,2	2,8± 2,8	3,3± 3,4
	200	68,9± 8,6	37,0± 7,9	3,4± 3,5	6,3± 6,5
sd-3-18	0	100,0± 9,6		329,6±29,2	
	10	102,0±17,9	109,2± 9,6	290,4±35,6	310,2±24,9
	50	99,0±12,0	69,4± 5,9	286,0±27,7	434,7±36,3
	100	99,6±11,6	69,6± 9,6	299,3±36,4	425,5±35,6
	200	77,9±10,5	54,2± 9,2	311,2±27,8	399,3±55,7

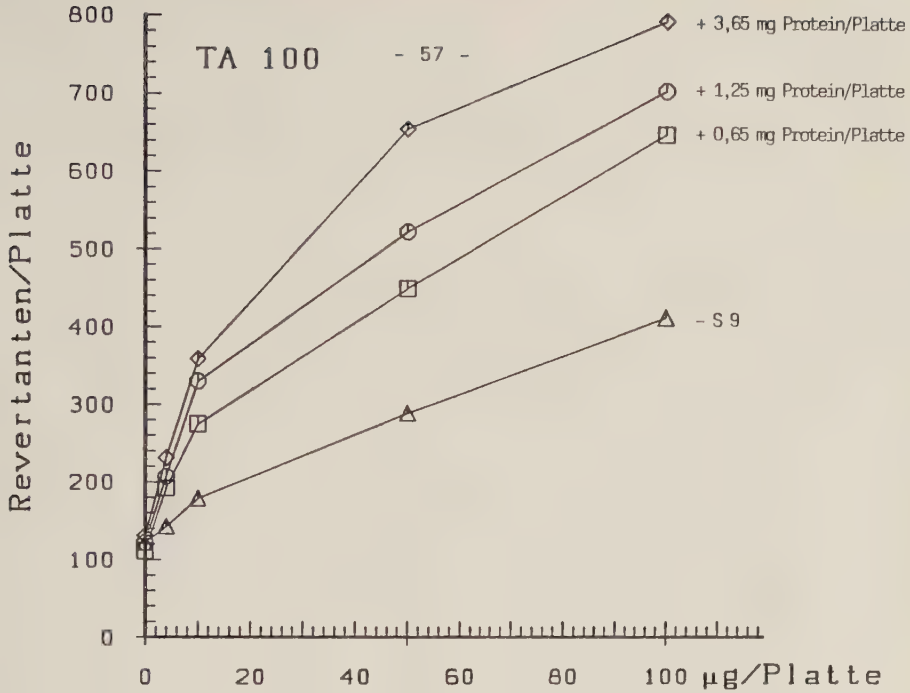
Tabelle 10: Einfluß von Quercetin auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii
Behandlungszeit: 24 Stunden

Behandlungsdauer auf 24 Stunden,wie aus Tabelle 10 ersichtlich, zu einem negativen Ergebniss.

Mutagenitätsuntersuchungen an Salmonella typhimurium

Die mutagene Aktivität von Quercetin wurde in den 5 Standardstämmen untersucht. Die Durchführung der Versuche erfolgte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines metabolisierenden Systems. Untersucht wurde ein Konzentrationsbereich von 0 µg pro Platte bis 100 µg pro Platte an Quercetin.

Es ergab sich eine gute Übereinstimmung der erzielten Revertantenzahlen mit bekannten Literaturdaten. Quercetin induziert Mutationen in den Stämmen TA 1537, TA 1538, TA 98 und TA 100. Im Stamm TA 1535 konnte weder mit noch ohne S9-Mix Zusatz eine mutagene Wirkung nachgewiesen werden. In den vorher genannten Stämmen jedoch bewirkt die Zugabe von S9-Mix eine deutliche Steigerung der Revertantenzahl pro Platte.
In den Stämmen TA 100 und TA 98 wurde daraufhin der Einfluß des exogenen metabolisierenden Systems auf die Mutagenität von Quercetin näher untersucht. Es wurde bei diesen Versuchen die Proteinmenge im S9-Mix variiert. Der Proteingehalt pro Platte betrug dabei 0; 0,62; 1,25 und 3,75 mg Protein pro Platte. Wie Abbildung 8 und Tabelle 11 zeigen, ist eine Zunahme der Revertantenzahl mit steigendem Proteingehalt im S9 zu beobachten. Dieser Effekt d.h. die Expression einer von der eingesetzten Proteinmenge abhängigen Mutagenität von Quercetin wurde bis jetzt in der entsprechenden Literatur noch nicht berichtet.



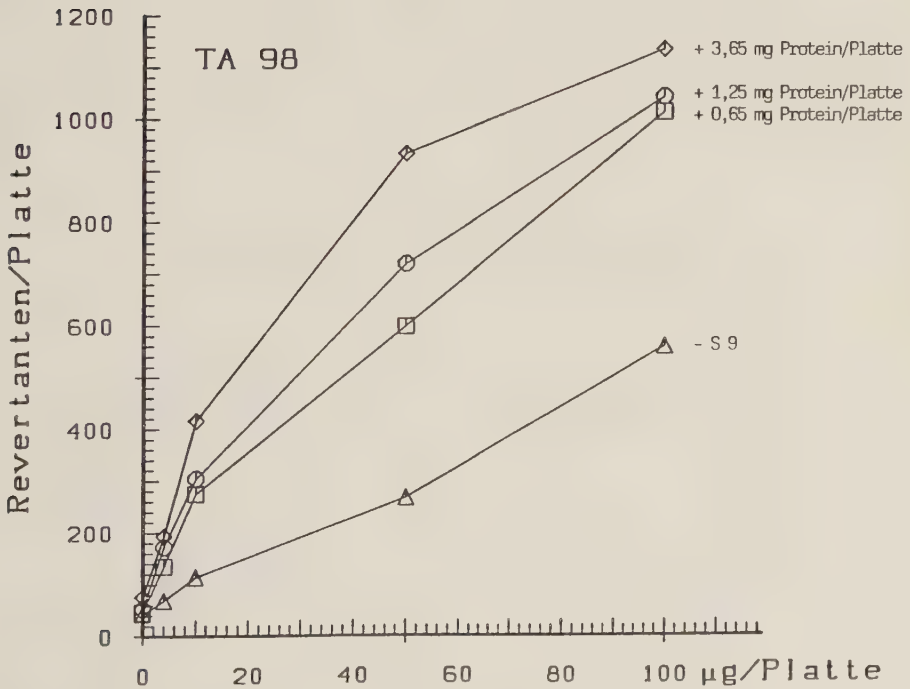


Abbildung 8: Versuch 1: Einfluß von Quercetin auf die Revertantenzahlen/Platte von Salmonella t. in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im verwendeten S 9-Mix

	c [µg/Platte]	-S9	+3,65	+1,25	+0,65	mg Protein/ Platte
TA 100	0	121± 7	126± 5	121± 3	124± 3	
	4	134± 6	233±20	204±15	187±14	
	10	183± 9	360±16	332±21	266±15	
	50	269±17	652±33	560±18	484±21	
	100	470±16	782±17	659±17	600±13	
	PK	440±23		545±28		
TA 98	0	45± 7	47± 4	56± 6	51± 3	
	4	80± 4	203±11	169±37	140± 7	
	10	124± 7	433±18	309±20	275±20	
	50	262±13	987±23	741±24	574±47	
	100	534±29	1146±33	1042±24	972±35	
	PK	434±19		450±36		

Tabelle 11: Versuch 2

Einfluß von Quercetin auf die Revertantenzahlen pro Platte von Salmonella typhimurium in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im verwendeten S9-Mix

3.2.2. Untersuchungen zur Mutagenität von ß-Asaron

Mutagenitätsuntersuchungen an Chlamydomonas reinhardii

ß-Asaron wurde bis zu einer Konzentration von 107 µg/ml Inkubationsansatz im Algensystem getestet. Die erzielten Ergebnisse sind der Tabelle 12 zu entnehmen.
Eine einstündige Behandlungszeit der Algen mit der Testsubstanz führte sowohl per se als auch in den Versuchsansätzen mit exogener metabolischer Aktivierung (Standard S9--Mix) zu keiner Induktion von Revertanten. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration im S9-Mix (7,5 mg Protein pro ml S9-Mix) konnte ebenfalls eine mutagene Wirkung von ß-Asaron nicht belegen. Eine toxische Wirkung der Testsubstanz konnte jedoch, wie an Hand der relativen Überlebensrate ersichtlich, nachgewiesen werden. Eine Ausdehnung der Behandlungsdauer auf 24 Stunden führte wegen der toxischen Einflüsse der Testsubstanz über diesen langen Zeitraum bei Chlamydomonas zu nicht auswertbaren Versuchen.

Mutagenitätsuntersuchungen an Salmonella typhimurium

ß-Asaron wurde im Bakteriensystem bis zu einer Konzentration von 1073 µg/Platte getestet. Wie Abbildung 9 und Tabelle 13 zeigen, konnte ß-Asaron nur im Stamm TA 100 und nur unter Zugabe eines metabolisierenden Systems, als Mutagen nachgewiesen werden. Sowohl mit als auch ohne Metabolisierung konnte in den Stämmen TA 1535, TA 1537, TA 1538 und TA 98 eine mutagene Wirkung dieser Substanz nicht gefunden werden.
Untersuchungen zum Einfluß des metabolisierenden Systems auf die Mutagenität von ß-Asaron führten zu vergleichbaren Ergebnissen, wie sie schon bei Untersuchungen zur Mutageni-

c [µg/ml]		rel.ÜR + SA in %			MR + SA		
		-S9	+2,5mg Protein/ml	+7mg Protein/ml	-S9	+2,5mg Protein/ml	+7mg Protein/ml
arg 1⁻	0	100,0± 7,5		100,0± 8,5	3,9± 2,2		1,6± 1,4
	10,7	93,0± 5,2	96,4±5,2	98,3± 9,2	6,2± 5,9	1,9± 1,7	1,7± 1,5
	21,5	87,9± 6,8	93,8±6,1	89,5±10,8	6,5± 4,4	4,1± 4,1	1,8± 1,6
	43,0	82,0± 6,8	87,9±3,7	84,1±12,7	2,3± 2,0	4,4± 2,5	4,0± 2,3
	107,0	69,6±10,6	69,6± 7,3	65,4± 9,0	5,6± 3,2	2,7± 2,4	2,5± 2,2
sd-3-18	0	100,0± 7,9		100,0±11,7	235,7±25,4		388,0±24,8
	10,7	99,5± 6,7	91,9±7,4	96,7±15,6	205,8±15,1	312,1±13,3	409,2±39,1
	21,5	90,9± 6,4	95,3±9,5	83,0± 7,1	297,9±22,7	284,1±22,2	430,2±34,0
	43,0	88,5± 4,0	80,9±6,5	74,5±13,5	216,5±15,1	298,3±28,0	432,6±36,0
	107,0	78,7± 7,0	74,8±7,0	49,8± 7,3	282,5±24,0	326,8±19,6	550,4±52,8

Tabelle 12: Einfluß von ß-Asaron auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

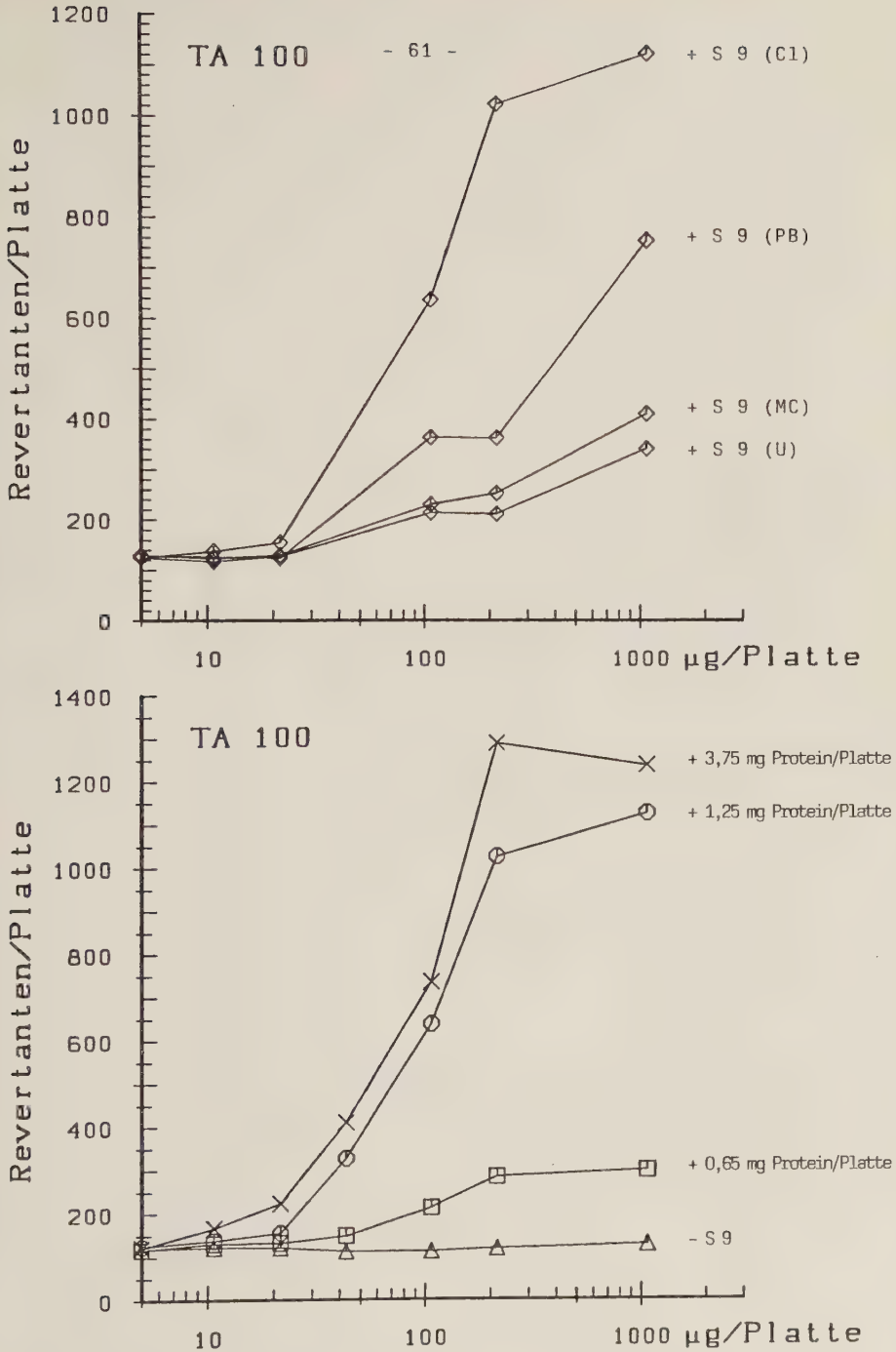


Abbildung 9: Versuch 1: Einfluß von ß-Asaron auf die Revertantenzahlen/Platte von Salmonella t. in Abhängigkeit vom verwendeten S 9 und der Proteinkonzentration im S 9-Mix

c [µg/Platte]	-S9	+0,62	+1,25	+3,75	mg Protein/ Platte
0	112±12	127± 7	120± 6	115± 6	
10,7	121± 5	161±12	138±12	129± 7	
21,5	122± 9	204± 9	160± 2	131± 4	
43,0	117± 3	385±19	340±18	141± 7	
107,0	118± 8	716±28	640±30	174± 6	
215,0	117± 4	1221±59	928±33	231±19	
1073,0	128±13	1153±67	1036±34	273± 9	
PK	340±28		473± 7		

Tabelle 13: Versuch 2

Einfluß von ß-Asaron auf die Revertantenzahlen pro Platte von Salmonella typhimurium im Stamm TA 100 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im S9-Mix

c [µg/Platte]	U	PB	MC	Cl
0	125± 7	133± 5	130± 4	125± 3
10,7	117±12	129± 6	127± 8	138± 9
21,5	134±11	124± 7	133± 4	155± 8
107,0	226±18	375± 9	235±13	639±26
215,0	210±11	382±17	247±18	1027±38
1073,0	340±13	750±27	402±18	1128±52
PK	921±32	295±29	505±20	488±21

Tabelle 14: Versuch 2

Einfluß von ß-Asaron auf die Revertantenzahlen pro Platte von Salmonella typhimurium im Stamm TA 100 in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der fur die S9 Herstellung verwendeten Ratten (U=unbehandelt, PB=mit Phenobarbital vorinduziert, MC=mit Methylcholanthren vorinduziert, Cl=mit Chlophen A 50 vorinduziert)

	TA 1535		TA 1537		TA 1538		TA 98		TA 100	
c [µg/Platte]	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
0	25±3	17±2	17±1	14±2	24±3	12±3	60±6	41±2	123± 7	124±5
10,7	27±6	17±3	16±1	13±3	26±2	11±3	58±7	36±4	135± 3	123±4
21,5	26±3	18±2	14±2	12±2	27±3	12±2	52±6	38±2	147± 9	124±7
43,0	29±4	22±2	12±1	11±3	24±4	12±3	64±5	44±5	295±20	125±6
107,0	26±3	21±2	16±4	12±2	16±3	14±1	57±4	40±6	554±39	123±3
215,0	26±4	20±3	18±2	16±3	22±2	11±2	52±1	32±4	850±47	125±7
1073,0	28±3	19±5	18±2	12±2	24±5	14±2	49±2	36±6	908±40	128±3

Tabelle 15: Einfluß von ß-Asaron auf die Revertantenzahlen pro Platte von Salmonella typhimurium

tät von Quercetin erbracht wurden. Auch bei ß-Asaron führte eine Steigerung des Proteingehalts im S9-Mix zu einer Erhöhung der Revertantenzahlen. Eine dosisabhängige Steigerung der Mutagenität von ß-Asaron durch die eingesetzte Enzymmenge konnte nachgewiesen werden.
Darüber hinaus konnte für die Aktivierung von ß-Asaron eine Abhängigkeit der Mutagenität von der Induktion bestimmter Enzyme in der Leber der Versuchstiere, aus denen der S9 gewonnen wurde, gezeigt werden. Der Einsatz von S9, der von unterschiedlich vorinduzierten Tieren gewonnen wurde, verändert je nach Vorbehandlung der Tiere das mit ß-Asaron in Salmonella erzielte Versuchsergebnis (Abbildung 9, Tabelle 14). Die Revertantenzahlen aus den Versuchen, die mit dem S9 unbehandelter Tiere und dem S9 von mit Methylcholanthren vorbehandelter Tiere durchgeführt wurden, unterschieden sich kaum. Wird aber der S9 von Clophen A 50 oder Phenobarbital vorbehandelter Tiere eingesetzt, erhöht sich die Zahl der Revertanten pro Platte bei gleicher Konzentration von ß-Asaron um mehr als den Faktor 2.

3.2.3. Untersuchungen zur Mutagenität von Aristolochiasäuren

Mutagenitätsuntersuchungen an Chlamydomonas reinhardii

Das Aristolochiasäuregemisch wurde in den Konzentrationen 50 µg/ml, 100µg/ml, 200 µg/ml und 400 µg/ml ausgetestet. Auch für das Aristolochiasäuregemisch konnte,wie Tabelle 16 zu entnehmen ist, keine mutagene Wirkung im Testsystem von Chlamydomonas reinhardii nach einstündiger Behandlung nachgewiesen werden. Der Zusatz eines exogenen metabolisierenden Systems und eine Erhöhung der Proteinkonzentration im S9-Mix auf 7,5 mg Protein pro ml S9-Mix führte ebenfalls nicht zu

	c [µg/ml]	rel. ÜR + SA in %			MR + SA		
		-S9	+2,5mg Protein/ml	+7mg Protein/ml	-S9	+2,5mg Protein/ml	+7mg Protein/ml
arg 1⁻	0	100,0±13,7		100,0±11,6	3,9± 2,2		1,3± 1,2
	50	91,2± 8,8	100,7±22,1	97,6± 7,7	2,1± 1,8	5,7± 3,9	1,4± 1,2
	100	99,0±10,4	95,9± 8,4	97,4± 7,4	5,8± 2,8	2,0± 1,7	2,8± 1,6
	200	95,1± 5,1	92,1±10,9	104,6± 9,1	6,1± 4,1	4,2± 2,4	2,7± 2,6
	400	88,9± 5,6	88,2± 9,8	97,1± 8,9	2,1± 1,9	6,5± 4,4	1,4± 1,2
sd-3-18	0	100,0±10,0		100,0± 8,9	263,4±17,8		320,6±26,2
	50	99,1±13,7	100,6± 8,8	93,3±13,9	262,2±18,7	301,6±16,4	303,0±33,2
	100	93.2± 2,1	93,1± 6,0	91,1±11,1	269,7±17,9	324,3±16,4	371,0±29,9
	200	88,5± 7,2	93,1± 9,2	96,0±10,2	261,3±18,8	218,0±17,6	294,0±30,0
	400	92,4± 5,2	95,6± 6,0	83,0±10,8	241,3±23,7	233,0±19,5	300,9±28,7

Tabelle 16: Einfluß von Aristolochiasäure (Mix) auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii
Behandlungszeit 1 Stunde

c [µg/Platte]		rel.ÜR + SA		MR + SA	
		-S9	+S9	-S9	+S9
arg 1-	0	100,0±12,5		2,8± 2,5	
	50	91,2±18,2	39,0±13,1	3,0± 2,7	3,0± 2,6
	100	83,1±20,5	86,8±12,0	3,3± 3,0	3,2± 2,8
	200	109,2±16,8	73,9±11,3	2,5± 2,2	3,8± 3,3
	400	106,2± 8,0	66,0± 9,6	2,6± 2,3	8,7± 5,0
sd-3-18	0	100,0±10,4		357,7±21,2	
	50	111,8±12,2	100,9±17,5	270,3±16,5	307,2±27,4
	100	113,8±13,2	94,4±11,6	260,4±23,2	382,8±24,8
	200	96,0±10,2	83,9± 9,0	242,8±19,8	331,8±24,8
	400	82,0±15,2	77,6±11,6	257,8±30,8	282,5±27,7

Tabelle 17: Einfluß von Aristolochiasäure auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende in Chlamydomonas reinhardii
Behandlungsdauer: 24 Stunden

einer Induktion von Revertanten. Eine Behandlungsdauer des Inkubationsansatzes von 24 Stunden hatte ebenfalls keine mutagene Wirkung der Testsubstanz in Chlamydomonas reinhardii zur Folge.

Mutagenitätsuntersuchungen an Salmonella typhimurium

Ausgetestet wurden im Bakteriensystem die Konzentrationen 50 µg/Platte, 100 µg/Platte, 160 µg/Platte und 200 µg/Platte. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse die mit dem Aristolochiasäuregemisch erhalten wurden. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, daß Aristolochiasäure sowohl Frame-Shift-Mutationen im Stamm TA 1537 als auch Basenpaarsubstitutionen im Stamm TA 100 erzeugt. Eine Konzentration von 200 µg/Platte an Aristolochiasäuregemisch erhöht im Stamm TA 1537 die Zahl der induzierten Revertanten um den Faktor 10 im Vergleich zur Kontrolle. Im Stamm TA 100 wurde eine 4-fache Steigerung der Revertantenzahlen beobachtet. Der Zusatz von S9-Mix erbrachte keine Veränderung der Revertantenzahlen. In den Stämmen TA 1535, TA 1538 und TA 98 konnte sowohl mit als auch ohne Zusatz von S9-Mix keine mutagene Wirkung des Aristolochiasäuregemisches festgestellt werden.
Auf Grund des positiven Befundes des Aristolochiasäuregemisches im Salmonellasystem, wurden die Reinsubstanzen des Gemisches in den Stämmen TA 100 und TA 1537 ebenfalls untersucht. Zusätzlich zu Aristolochiasäure I und Aristolochiasäure II wurde auch Aristolactam I, das als Metabolit von Aristolochiasäure I angesehen wird, in die Untersuchungen mit einbezogen. Die mit den Reinsubstanzen erzielten Ergebnisse können Abbildung 11 und 12 und der Tabelle 20 entnommen werden. Im Stamm TA 100 konnte eine mutagene Wirkung der beiden Aristolochiasäuren nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich das Aristolochiasäure II im Stamm TA 100 ein etwas höheres mutagenes Potential besitzt als Aristolochiasäure I. Im Stamm TA 1537 ergaben sich unterschiedlich hohe

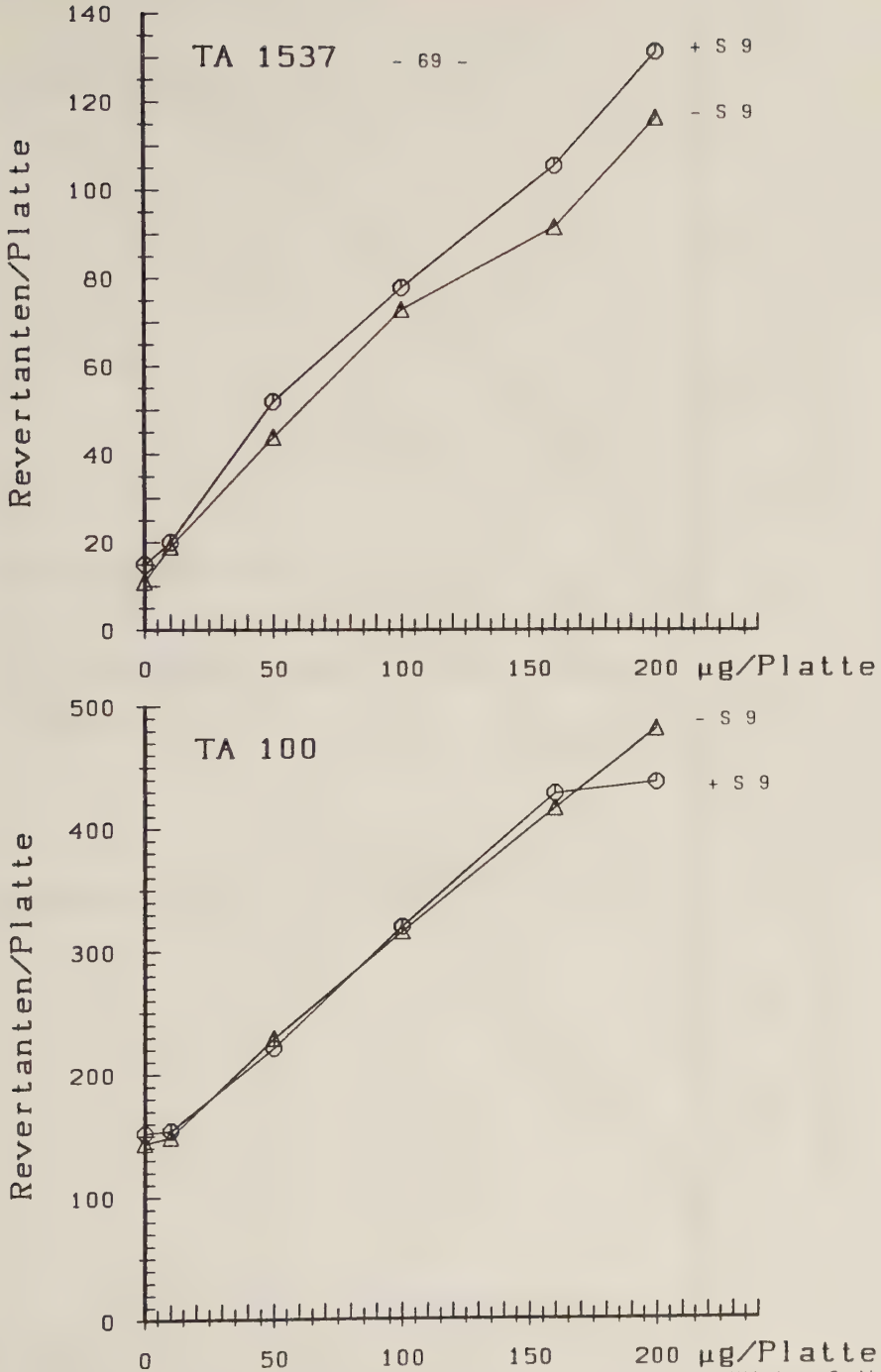


Abbildung 10: Versuch 1:Einfluß von Aristolochiasäure (Mix) auf die Revertantenzahlen/Platte von Salmonella t.

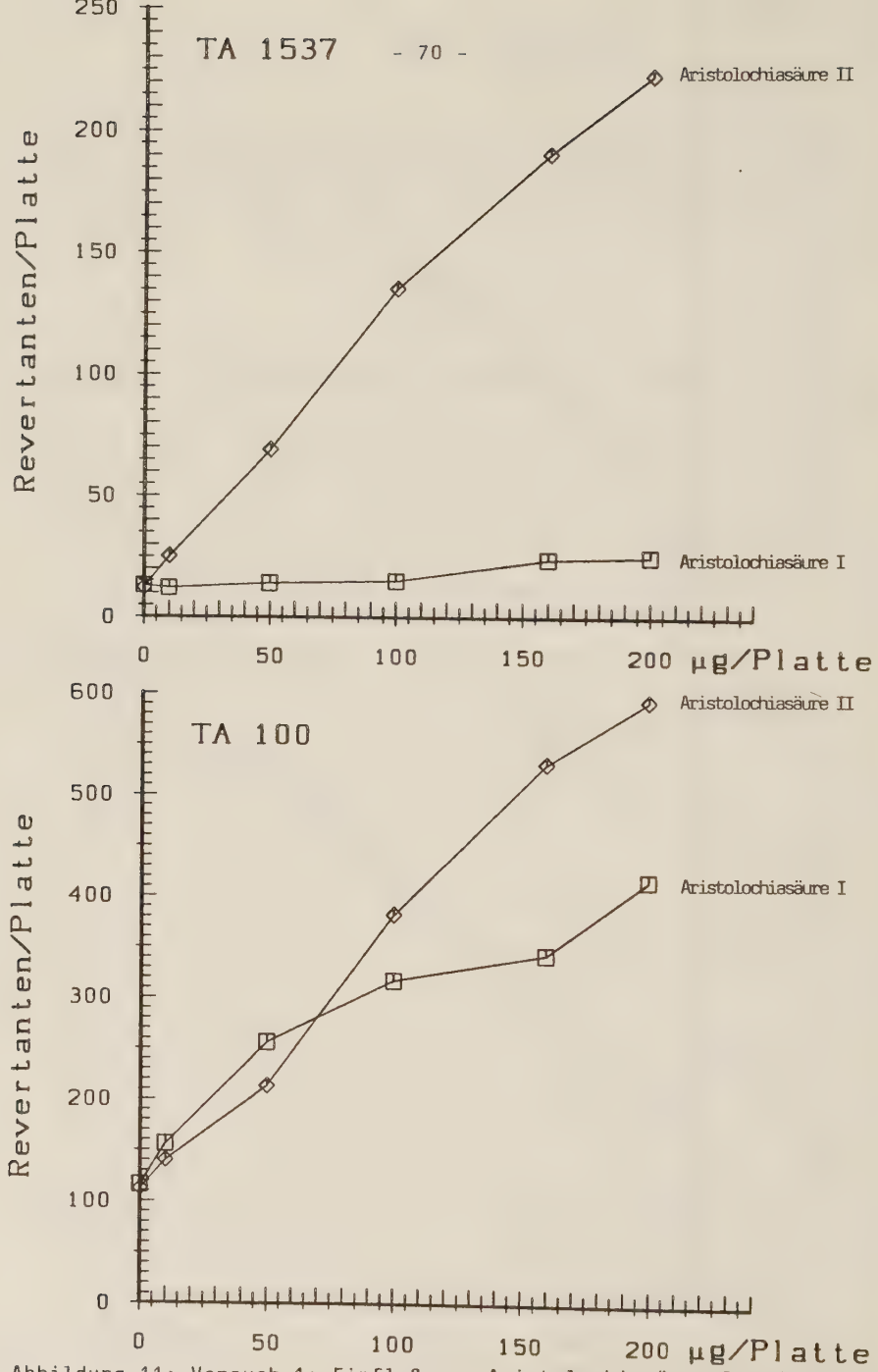


Abbildung 11: Versuch 1: Einfluß von Aristolochiasäure I und II auf die Revertantenzahlen/ Platte von Salmonella t.

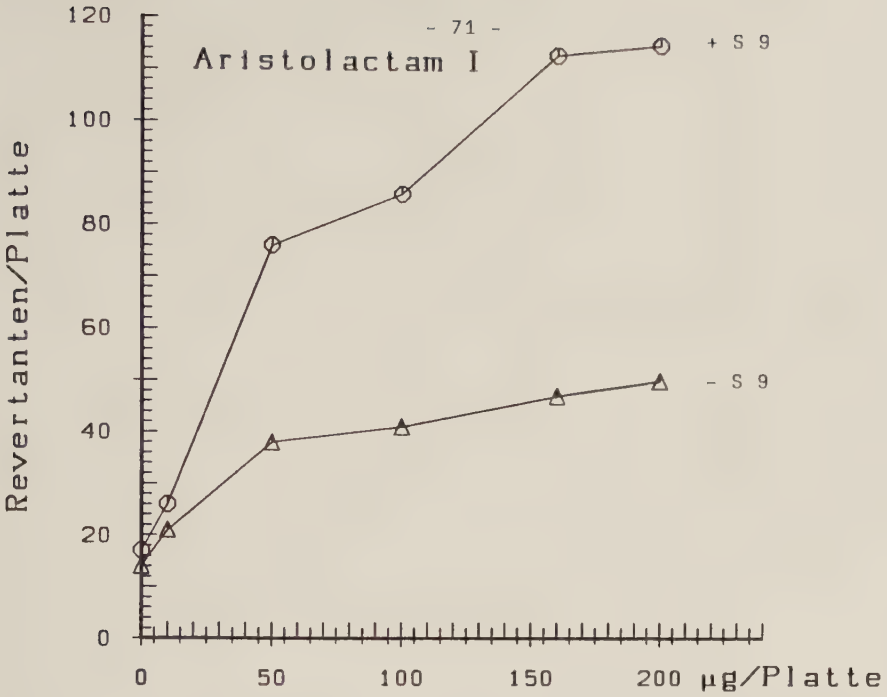
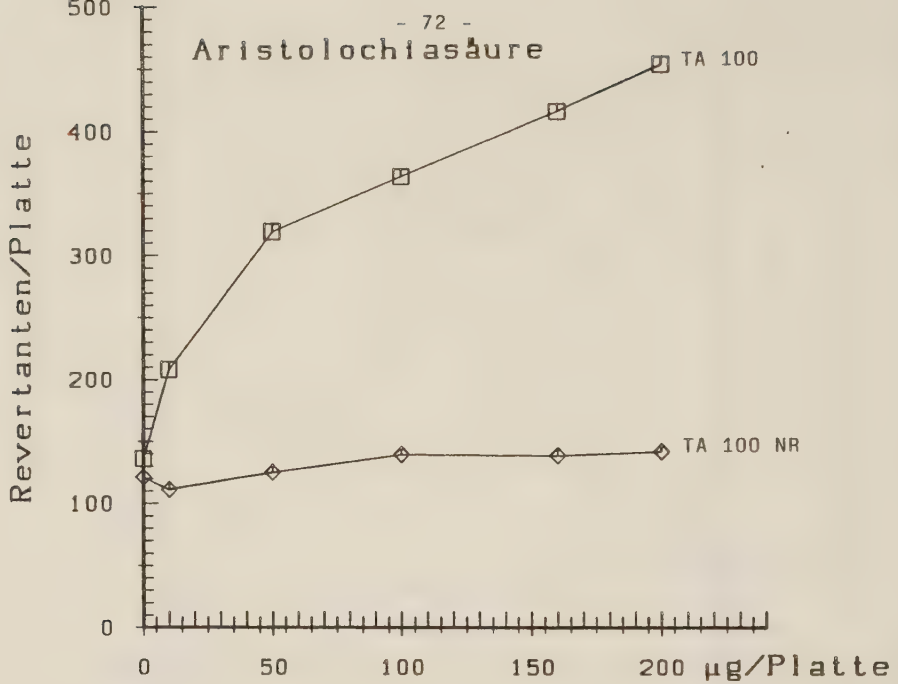


Abbildung 12: Versuch 1: Einfluß von Aristolactam I auf die Revertantenzahlen/ Platte im Stamm TA 1537 von Salmonella typhimurium



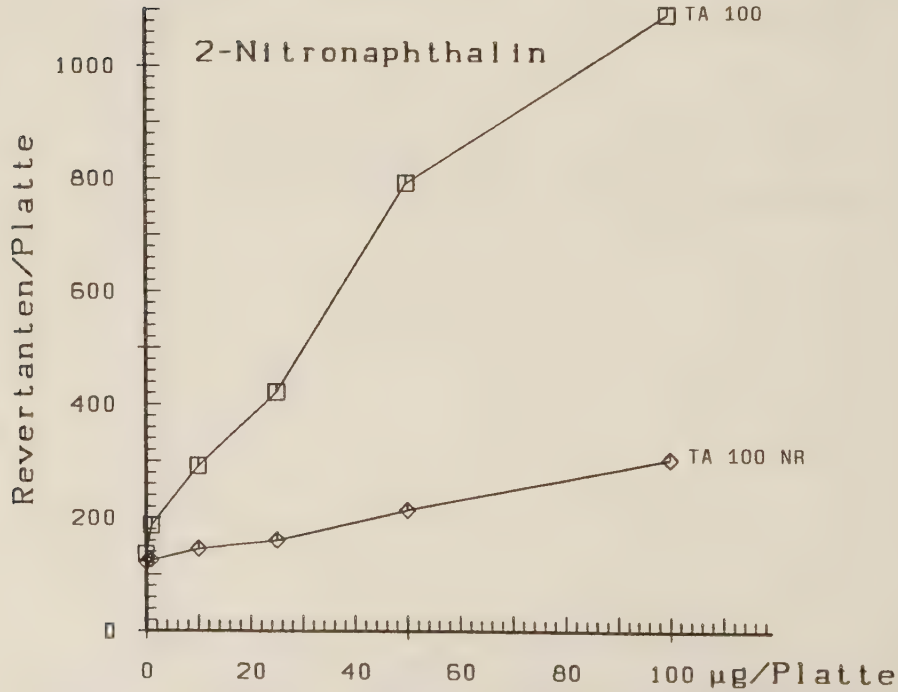


Abbildung 13: Versuch 1: Einfluß von Aristolochiasäure (Mix) und 2-Nitronaphthalin auf die Revertantenzahlen/Platte von Salmonella t.

c [µg/pl]	TA 100		TA 1537	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0	142± 6	136± 5	12± 3	14± 3
10	152± 8	149± 6	20± 8	20± 4
50	245±16	238±10	46± 7	54± 7
100	344±12	329±13	68±12	76± 8
160	452±22	476±35	87± 9	92±11
200	448±16	453±15	112±17	124±12
PK	492±28	483±96	192±42	124±18

Tabelle 18: Versuch 2:
Einfluß von Aristolochiasäure (Mix) auf die Revertantenzahlen/Platte von Salmonella t.

c [µg/pl]	TA 1535		TA 1538		TA 98	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	17± 2	17± 1	17± 2	18± 3	47± 5	58± 4
10	17± 3	15± 2	15± 4	12± 2	49± 4	64± 4
50	18± 2	17± 3	16± 1	16± 2	54± 9	64± 5
100	22± 2	22± 3	13± 3	19± 4	50± 9	66± 6
160	21± 1	18± 5	11± 2	21± 5	54± 4	66± 4
200	19± 4	17± 3	15± 4	22± 5	56± 7	74± 2
PK	272±13	133±17	639±35	364±20	430±22	554±21

Tabelle 19: Einfluß von Aristolochiasäure (Mix) auf die Revertantenzahlen/Platte von Salmonella t.

	TA 100				TA 1537			
c [µg/Platte]	A.I	A.II	AL.I		A.I	A.II	AL.I	
	-S9	-S9	+S9	-S9	-S9	-S9	+S9	-S9
0	109± 9		156± 6		12±1		19± 2	
10	145±13	150±11	170± 2	159± 6	14±1	51±10	29± 7	23±2
50	247±10	221±26	172±11	177± 5	13±1	51±10	56± 2	34±4
100	320±17	393± 8	163±10	161± 6	19±2	130±10	66± 4	40±1
160	352± 9	518±28	181± 9	167±14	27±3	160± 3	68±11	48±2
200	406±10	531±29	185±11	182± 7	30±1	182±13	91±15	50±5
PK	359±22		469±14		127±2		166±15	

Tabelle 20: Einfluß von Aristolochiasäure I (A.I), Aristolochiasäure II (A.II) und Aristolactam I (AL.I) auf die Revertantenzahlen pro Platte von Salmonella t.

Potentiale der Mutagenität. Nur Aristolochiasäure II konnte im Stamm TA 1537 Frame-Shift-Mutationen induzieren, während Aristolochiasäure I keine Mutationsinduktion bewirkte. Zugabe von S9-Mix hatte keinen Einfluß auf die Induktion von Revertanten durch die beiden Reinsubstanzen.
Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Aristolactam I konnten eine geringe direkte mutagene Wirkung dieser Substanz nur im Stamm TA 1537 aufzeigen. Der Zusatz von S9-Mix wirkt sich dabei durch eine Erhöhung der durch Aristolactam I induzierten Revertanten aus. Im Stamm TA 100 konnte keine mutagene Wirkung dieser Substanz nachgewiesen werden.
Um Hinweise auf den biologischen Wirkungsmechanismus des Aristolochiasäuregemisches zu erhalten, wurde in einer weiteren Versuchsserie der nitroreduktasedefiziente Stamm TA 100 NR eingesetzt. In den mit diesem Stamm durchgeführten Versuchen konnte die mutagene Potenz des Aristolochiasäuregemisches nur noch sehr schwach nachgewiesen werden. Wie Abbildung 13 aufzeigt, wurde ähnlich,wie bei dem aus der Literatur bekannten 2-Nitronaphtalen, das hier als Kontrolle diente, eine weitgehende Eliminierung der mutagenen Wirkung des Aristolochiasäuregemisches festgestellt.

3.2.4. Untersuchungen zur Mutagenität von Bergapten

Mutagenitätsuntersuchungen an Chlamydomonas reinhardii

Die Versuche mit Bergapten (5 MOP) weichen etwas vom üblichen Versuchsschema ab. Die Versuchsdurchführung der Experimente unter Einsatz von UV-A Bestrahlung wurden aber im Abschnitt "Material und Methode" schon ausführlich dargelegt.

Wie Tabelle 21 zu entnehmen ist, wirkt 5 MOP in einer Konzentration von 5 µg/ml im Dunkeln sowohl bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten als auch bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden nicht mutagen in Chlamydomonas. Auch der Zusatz von S9-Mix (2,5 mg Protein/ml S9-Mix) führte zu keiner Induktion von Revertanten.
Durch die Behandlung der Chlamydomonaszellen mit 5 µg/ml 5 MOP und einer anschließenden Bestrahlung des Versuchsansatzes mit UV-A (20 Minuten bei einer Raumbestrahlungsstärke von 2 W/m²) kann jedoch eine starke mutagene Wirkung in Chlamydomonas erzielt werden. Dieser bekannte Effekt diente in den darauffolgenden Versuchen als Kontrollwert (K). Wegen der beobachteten Phototoxizität bei einer Bestrahlung von 20 Minuten mit UV-A wurde in den folgenden Versuchen nur 10 Minuten mit UV-A bestrahlt.
Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse, die durch den Zusatz von S9-Mix zum Testansatz erzielt wurden. Die Zugabe eines exogenen metabolisierenden Systems führt zu einer signifikanten Erniedrigung der mutagenen Wirkung von 5 MOP + UV-A in Chlamydomonas. Die Abnahme der Reversionsrate durch Zusatz von S9-Mix ist dabei von der eingesetzten Enzymmenge abhängig. Sowohl im System der arg 1⁻ - als auch der sd-3-18 - - Mutante konnte eine von der eingesetzten Enzymmenge dosisabhängige Erniedrigung der Reversionsraten beobachtet werden. Der S9-Mix mit der höchsten Proteinkonzentration bewirkte dabei die größte Reduktion der Reversionsraten.
Alle durchgeführten Versuche bestätigten das in Abbildung 14 dargestellte Ergebnis.Auf eine Darstellung der Versuche 2 und 3 wurde deshalb verzichtet.

Um auszuschließen, daß unspezifische Bindungen an die im S9-Mix enthaltenen Enzyme für die auftretenden Reaktionen verantwortlich sind, wurden Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Diese Versuche sollten zeigen ob das NADP-abhängige "mixed-function oxidases"-System hauptsächlich für die Senkung der Reversionsraten verantwortlich ist. Durch das Weglassen des NADP im S9-Mix konnte in diesen Versuchen eine Metabolisierung durch das exogene System nicht mehr erfolgen. Wie aus Tabelle 21 ersichtlich, sind die Reversionsraten in diesen Versuchen im Vergleich zu den Ansätzen ohne S9-Mix

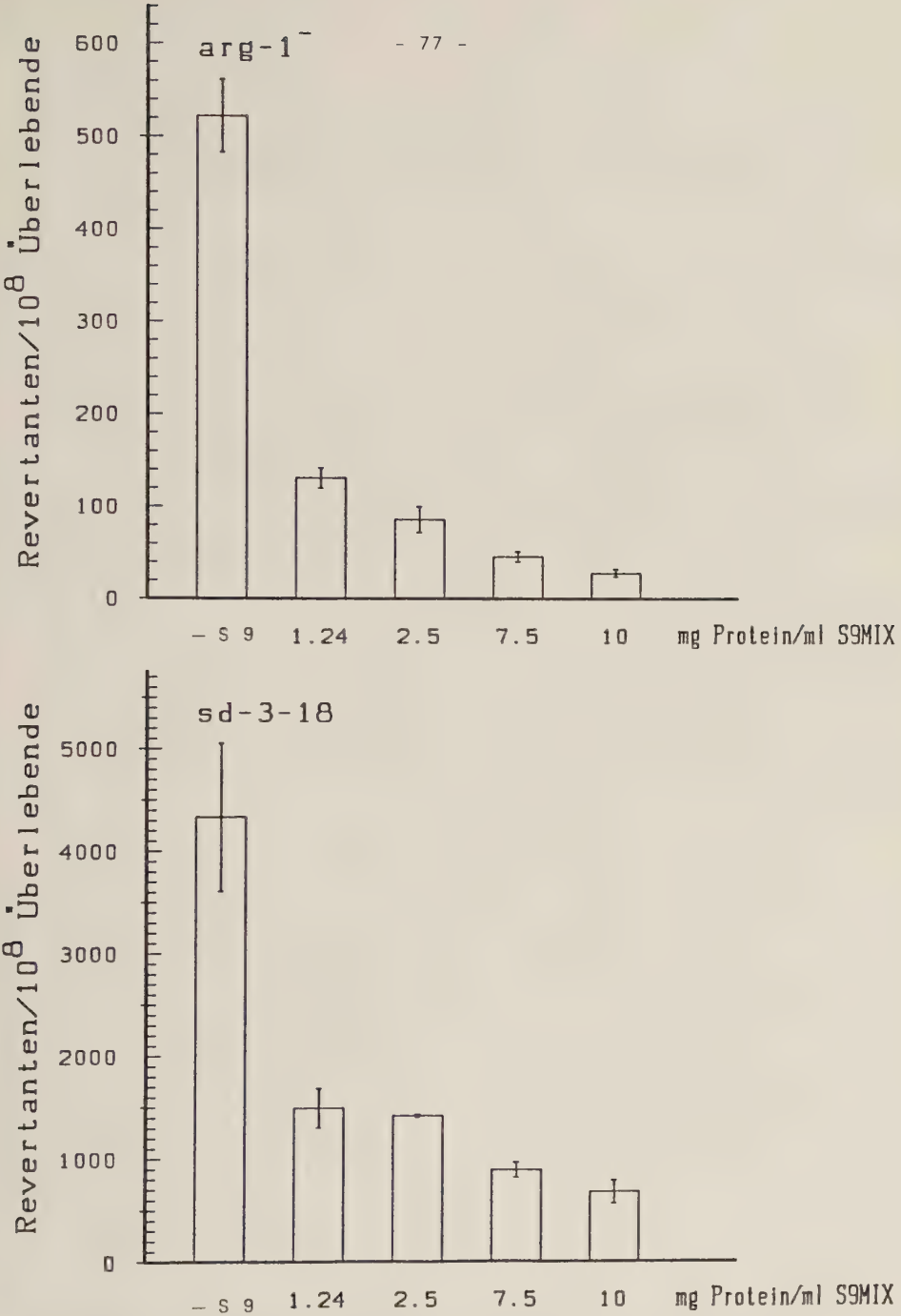


Abbildung 14: Versuch 1: Einfluß von 5µg/ml 5-MOP +10 min UV-A auf die Mutationsrate von Chlamydomonas r.in Abhängigkeit von der im S 9-Mix verwendeten Proteinkonzentration

		rel. ÜR + SA in %	MR + SA
arg 1⁻	Kontrolle	100,0± 9,1	4,3± 2,4
	+20 min Dunkel -S9	102,0±11,2	2,0± 2,1
	+20 min Dunkel +S9	100,3±12,2	4,2± 2,4
	+20 min UV-A -S9	44,3±11,3	1839,1±211,9
	+20 min UV-A +S9 (-NADP)	45,0±12,2	1445,3±179,2
	+24 h Dunkel +S9	117,0±10,7	5,3± 3,2
sd-3-18	Kontrolle	100,0±13,2	340,3± 28,8
	+20 min Dunkel -S9	102,9±10,8	279,0± 27,2
	+20 min Dunkel +S9	96,4± 5,9	317,7± 26,1
	+20 min UV-A -S9	13,7± 2,0	5823,5±498,5
	+20 min UV-A +S9 (-NADP)	17,9± 3,8	4072,1±399,9
	+24 h Dunkel +S9	115,0±12,4	241,2± 24,2

Tabelle 21: Einfluß von 5 µg/ml Bergapten auf die relative Überlebensrate und Mutationsrate (Angabe als Revertanten pro 10^8 Überlebende) in Chlamydomonas reinhardii

Zugabe nur etwas erniedrigt. Die Unterschiede der durch diese verschiedene Behandlung erzielten Reversionsraten sind auf Grund von Berechnungen als nicht signifikant anzusehen.

Mutagenitätsuntersuchungen an Salmonella typhimurium

Eine Behandlung der Teststämme TA 98 und TA 100 mit Bergapten im Standard-Amestest, d. h. ohne Bestrahlung, zeigte keinen mutagenen Effekt der Testsubstanz in diesen Teststämmen. Zusatz von S 9-Mix, sowie Variationen im Proteingehalt des S 9-Mix hatten ebenfalls, wie aus Tabelle 22 ersichtlich, keine mutagene Wirkung der Testsubstanz zur Folge.
Eine mutagene Wirkung von 5 MOP +UV-A war wegen der hohen Toxizität der PUVA-Behandlung in den verwendeten Salmonellastämmen nicht zu ermitteln. Schon eine Bestrahlungszeit von 4 Minuten führte zu nicht auswertbaren Versuchsergebnissen. Eine Bestrahlung der Kontrollplatten mit UV-A hatte ein Wachstum von Bakterien auf diesen Platten zur Folge,das weit über den üblichen Spontanraten der jeweiligen Teststämme lag.Zudem zeigten die Standardabweichungen oftmals nicht mehr akzeptable Werte auf. Das Wachstum vieler winziger, zählbarer Kolonien auf diesen Platten war ebenfalls zu beobachten. Eine Unterscheidung zwischen Background und echten Revertanten war deshalb nicht mehr möglich. Ähnliche Befunde konnten auch in den Versuchsansätzen mit 5 MOP, auch unter Einbeziehung von S 9-Mix,nach einer Bestrahlung mit UV-A beobachtet werden.

	TA 100			TA 98			
c [ug/ml]	-S9	+1,25	+3,75	-S9	+1,25	+3,75	mg Protein/ Platte
0	124± 9		137±10	44± 9		51± 5	
1	147± 5	144±14	143± 3	51± 5	63±9	65± 1	
5	150±17	159±15	142±12	48± 8	49±8	78± 6	
10	170± 8	180± 8	163± 7	63± 7	70±4	70± 8	
PK	395±28		483±98	552±24		566±139	

Tabelle 22: Einfluß von Bergapten auf die Revertantenzahlen pro Platte in Salmonella typhimurium im Dunklen

4. Diskussion

Um das genetische Risiko von Substanzen beurteilen zu können, stehen verschiedene Testsysteme zur Verfügung. Ein Testsystem hat für sich gesehen aber nur eine begrenzte Aussagekraft, da die genetischen und metabolischen Besonderheiten des Testorganismus für eine Risikoanalyse nicht uneingeschränkt auf den menschlichen Organismus übertragen werden können. Um aussagekräftigere Informationen über das Spektrum der biologischen Aktivitäten von Testsubstanzen zu erhalten, wurden sogenannte Testbatterien d.h. eine Kombination von ausgewählten Testsystemen mit verschiedenen Testorganismen und genetischen Endpunkten entwickelt (Ashby 1982, Dean et al 1982).
An prokaryotischen Testorganismen werden insbesondere die Bakterien Salmonella typhimurium (Ames et al 1975), E.coli (Mohn et al 1980) und Bacillus subtilis (MacGregor et al 1976) verwendet. Der Einsatz von eukaryotischen Mikroorganismen in der Mutagenitätsforschung bietet im Gegensatz zu prokaryotischen Testorganismen den Vorteil einer höher entwickelten DNA Organisation in Chromosomen, wie man sie auch in Säugerzellen findet. Die Ascomyceten Saccharomyces cerevisiae (Zimmermann 1973), Schizosaccharomyces pombe (Loprino et al 1974),sowie Neurospora crassa (De Serres et al 1971) und Aspergillus nidulans (Roper 1971) sind Organismen etablierter Testsysteme. Die Möglichkeit einer Metabolisierung der Testubstanz in Kultur durch Zusatz geeigneter Lebermikrosomenfraktionen, eröffnete den Mutagenitätstests mit Mikroorganismen neue Aussagemöglichkeiten und eine engere Korrelation der erzielten Ergebnisse im Bezug auf den menschlichen Organismus.
Chlamydomonas reinhardii ist ein eukaryotischer Mikroorganismus, der allerdings bisher ohne exogene metabolisierende Komponente im Testsystem, bei Mutagenitätsuntersuchungen ein-

gesetzt wird (Schimmer 1977, Schimmer 1980). Diese eingeschränkte Aussagefähigkeit war unter anderem dafür verantwortlich, daß dieser Phytoflagellat als Testorganismus in sogenannten Testbatterien wenig Verwendung fand. Mit der Einführung einer metabolisierenden Komponente konnte diese Lücke geschlossen und erstmals reproduzierbare, dosisabhängige Effekte von chemischen Mutagenen, die eine exogene Metabolisierung benötigen, um mutagen wirken zu können, gemessen werden.
Zur Evaluierung des Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystems wurden bevorzugt in Chlamydomonas noch nicht untersuchte Alkylantien eingesetzt und sollen im folgenden mit Literaturdaten aus anderen Testsystemen vergleichend diskutiert werden. Um darüber hinaus auch die biologischen Effekte von Substanzen, die über andere bzw. unbekannte Mechanismen und Reaktionen mit der DNA wirksam sind, zu prüfen, wurden daneben noch ausgewählte Naturstoffe einer vergleichenden Untersuchung in den zwei Testsystemen unterzogen und hier diskutiert.

Die Ergebnisse die bei der Behandlung der Chlamydomonaszellen mit den Alkylantien erzielt wurden, stehen im Einklang mit Resultaten, die in den meisten anderen mikrobiellen Testsystemen mit diesen Substanzen erhalten wurden und belegen damit die Praktikabilität des erweiterten Algensystems. Im Falle der vier untersuchten Standardmutagene wurden erstmals Dosis-Effekt-Beziehungen für diese Mutagene auch in Chlamydomonas gefunden und näher untersucht. Neben zwei direkt wirksamen Mutagenen wurden auch zwei indirekt wirkende Mutagene im Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem geprüft.

ENU zählt ebenso wie das bereits von anderen Autoren in Chlamydomonas untersuchte MNNG (Schimmer et al 1975) zu den direkt wirksamen Nitrosoverbindungen. Zum ersten Mal konnte in den durchgeführten Versuchen,wie Abbildung 3 zeigt, auch

für ENU eine mutagene Wirkung im Algensystem belegt werden. Die direkte mutagene Wirkung von ENU in Chlamydomonas konnte kürzlich durch eine Mitarbeiterin unseres Instituts bestätigt werden (Borrmann 1985). Bei den etwas höheren Werten für die Mutagenität von ENU in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den eben zitierten Ergebnissen muß beachtet werden, daß die Versuche bei einer unterschiedlich hohen Temperatur durchgeführt wurden und eine Temperaturerhöhung zu kürzeren Halbwertszeiten bei der Zerfallsrate von N.Nitrosoverbindungen führt (de Kok et al 1983). Zudem ist bekannt, daß die Mutagenität chemischer Substanzen in Chlamydomonas stark von der Ausgangszellzahl abhängig ist (Schimmer 1981). Die relativ schwache Wirkung von ENU in Chlamydomonas im Vergleich zu MNNG (Schimmer et al 1975) steht im Einklang mit Veröffentlichungen über die mutagene Wirkung dieser beiden Substanzen in anderen Testsystemen (Bartsch et al 1983, Vogel et al 1983). Ebenso wie bei E.coli (Mohn 1984) konnte auch im Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem keine signifikante Änderung der mutagenen Wirkung von ENU durch S9-Mix Zugabe beobachtet werden. Während die mutagene Wirkung von MNNG durch S9-Mix Zugabe erniedrigt wird, ist dies bei ENU nicht der Fall (Mohn 1984).
Das ultimative Mutagen des ENU, das letztlich mit der DNA reagiert, entsteht durch spontane Hydrolyse (Margison et al 1979). Ethylierung der DNA findet dabei über das intermediär gebildete alkylierende Alkyldiazoniumion statt, das dann ebenfalls das entsprechende Karboniumion liefert (Lawley et al 1975). Dabei konnte eine bevorzugte Ethylierung des O^6-Guanin durch ENU nachgewiesen werden. Wie Hince et al (1974) an E.coli zeigen konnten, löst ENU bevorzugt an Replikationsregionen Mutationen aus. Auch für Chlamydomonas ist ein solcher Angriffsort denkbar und wird diskutiert (Borrmann 1985).
Letale Effekte des ENU konnten im ausgetesteten Konzentrationsbereich an Hand der ermittelten Überlebensraten ausgeschlossen werden. Nach Knox et al (1976) sollen zwar die beim Zerfall

von ENU ebenfalls auftretenden Cyanationen cytotoxisch wirken, sie scheinen aber unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht zu entstehen oder keinen Einfluß auf Chlamydomonas auszuüben.

Als zweites direkt wirksames Standardmutagen wurde 2-NF in Chlamydomonas untersucht. Die Ergebnisse, die bei der Behandlung der Chlamydomonaszellen mit 2-NF erzielt wurden, konnten zum ersten Mal eine direkte mutagene Wirkung dieser Substanz im Algensystem nachweisen. Im Gegensatz zu den Versuchen mit ENU zeigten aber die Ergebnisse der Reversionsraten, einmal mit und einmal ohne S9-Mix Zugabe ermittelt, signifikante Unterschiede. Der Zusatz eines metabolisierenden Systems erhöht die Reversionsrate gegenüber den Testansätzen ohne S9-Mix signifikant. Vergleicht man die erzielten Ergebnisse mit Veröffentlichungen zur mutagenen Wirkung von 2-NF in anderen mikrobiellen Testsystemen, so kann man eine weitgehende Übereinstimmung der Befunde feststellen. Sowohl bei Saccharomyces cerevisiae (Simmon 1979) als auch in bakteriellen Testsystemen wie Salmonella typhimurium und E.coli (McCoy et al 1981) wirkt 2-NF als direktes Mutagen. Eine Steigerung der mutagenen Wirkung von 2-NF durch den Zusatz von S9-Mix steht ebenso im Einklang mit Resultaten, die in anderen Testsystemen erzielt wurden (Rosenkranz 1983). Auch die Untersuchungen von Pederson et al (1982), die erst durch Zusatz von S9 zum Testansatz die mutagene Wirkung von 2-NF in NR-Stämmen von Salmonella typhimurium nachweisen konnten, belegen den Einfluß von bestimmten im S9 enthaltenen Enzymen auf die Mutagenität von 2-NF. Eine Erhöhung der durch 2-NF induzierten Reversionsrate in Chlamydomonas durch den Zusatz von S9-Mix könnte auf die Bildung von mehr bzw. anderen, mutagen wirkenden Metaboliten des 2-NF zurückzuführen sein.

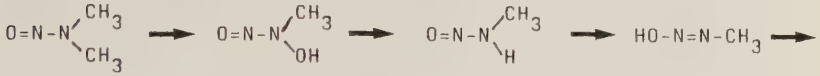
Die Fähigkeit der Nitroaromaten, zu denen ja auch 2-NF zählt, mutagen zu wirken, hängt stark von der enzymatischen Aus-

stattung der Testorganismen ab (Rosenkranz et al 1983). In diesem Zusammenhang werden zwei unterschiedliche Reaktionswege,die zu mutagen wirkenden Metaboliten führen können diskutiert. Der am besten untersuchte Weg wird bei Bakterien beschrieben (McCoy 1984). Dabei ist die Reduktion der Nitrogruppe durch bakterieneigene Nitroreduktaseenzyme von entscheidender Bedeutung. Die ultimativen Mutagene, die letztlich mit der DNA reagieren, sind die während der Metabolisierung entstandenen reaktiven Nitreniumionen und Arylhydroxylamine sowie stark elektrophile Hydroxamsäureester (McCoy et al 1983). Der zweite Reaktionsweg, der zu mutagen wirkenden Metaboliten führen kann, ist nicht von einer Reduktion der Nitrogruppe abhängig, sondern führt nach Aktivierung zu mutagen wirkenden Ringoxidationsprodukten (El-Bayoumy et al 1983). Dies wurde auch an Arbeiten mit nitroreduktasedefizienten Stämmen von Salmonella typhimurium belegt (McCoy et al 1983). Betrachtet man die im Testsystem von Chlamydomonas erzielten Ergebnisse unter diesen Gesichtspunkten, so kann man die direkte mutagene Wirkung von 2-NF entweder auf das Vorhandensein von für 2-NF spezifischen Nitroreduktaseenzyme und bwz. oder oxidativ auf die Nitroaromatenstruktur wirkenden Enzyme zurückführen. Für Saccharomyces cerevisiae, in dem 2-NF ebenfalls direkt mutagen wirkt, ist das Vorhandensein von Nitroreduktaseenzymen aus der Literatur bekannt (Rosenkranz et al 1983). Daß für die Metabolisierung der einzelnen Nitroaromaten substratspezifische Enzyme verantwortlich sind, kann auch den Untersuchungen von Aristolochiasäure, auf die im weiteren Verlauf der Diskussion noch näher eingegangen wird, entnommen werden. Untersuchungen zur Mutagenität von Aristolochiasäure in NR-Stämmen von Salmonella typhimurium konnten auch nach Zusatz von S9-Mix keine Mutagenität dieser Substanz nachweisen (Robisch et al 1982,Schmeisser 1984).Vergleicht man diese Ergebnisse mit den schon genannten Ergebnissen von McCoy et al, so müssen also unterschiedliche Enzyme für die Aktivierung von 2-NF und Aristolochiasäure in Chlamydomonas verantwortlich

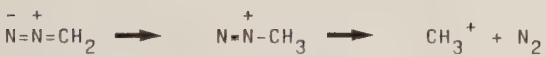
sein. Den vorliegenden Untersuchungen zur Folge besitzt Chlamydomonas die notwendige Enzymausstattung,die für eine Verstoffwechslung des 2-NF zu mutagen wirkenden Metaboliten führt. Auch die im S9 enthaltenen Enzyme sind in der Lage,2-NF zu mutagen wirkenden Metaboliten umzuwandeln, was durch die Steigerung der Reversionsrate nach S9-Mix Zugabe deutlich wird. Unterstützung findet diese Annahme durch die Befunde,die eine Nitroreduktaseaktivität im S9 für bestimmte Nitroaromaten (Rosenkranz et al 1975, Rosenkranz et al 1976) und eine oxidative Wirkung von im S9 enthaltenen Enzymen (Tong et al 1982),belegen konnten.
Der Chlamydomonas/Mikrosomen Test stellt somit ein geeignetes System für den Nachweis der mutagenen Wirkung von 2-NF dar.

Auch die Ergebnisse, die bei der Behandlung der Chlamydomonaszellen mit indirekt wirkenden Alkylantien erzielt wurden, stehen im Einklang mit Resultaten, die in den meisten anderen mikrobiellen Testsystemen erhalten wurden. Ebenso wie bei Salmonella typhimurium (Prival et al 1979), Saccharomyces cerevisiae (Brusick et al 1974) und bei Neurospora crassa (Malling 1966) konnte eine mutagene Wirkung von DMN nur in den Testansätzen,die eine metabolisierende Komponente enthielten, gemessen werden. Vegetative Zellen von Chlamydomonas haben demzufolge nicht die Enzymausstattung um DMN zu mutagenen Metaboliten zu verstoffwechseln. Im Gegensatz zu höheren Pflanzen (Veleminsky et al 1968, Gichner et al 1980) und Zygoten von Chlamydomonas reinhardii (Preidel 1984) wirkt DMN in vegetativen Zellen von Chlamydomonas reinhardii ohne enzymatische oder hydrolytische Aktivierung nicht mutagen. Weiterhin wird aus den durchgeführten Untersuchungen deutlich, daß die Enzymausstattung der vegetativen Zellen von Chlamydomonas von derjenigen der Zygotenzellen, in Bezug auf die Fähigkeit DMN zu metabolisieren, verschieden ist. Eine Metabolisierung von DMN durch ein zugeführtes metabolisierendes System ist demzufolge erforderlich, um die mutagene

Potenz dieser Testsubstanz in den vegetativen Zellen von Chlamydomonas reinhardii nachzuweisen.
Die Metabolisierung des DMN durch aus Rattenleber gewonnenen S9 könnte zu den gleichen alkylierenden Metaboliten führen, wie sie auch in vivo in der Leber von Ratten gebildet werden (Bowman et al 1980). Dieser Aktivierungsmechanismus ist im folgenden schematisch dargestellt:



Dimethyl-nitros-amin — Methylhyd-roxynitros-amin — Methylnitros-amin — Methyldiazo-hydroxyd



Diazo-methan — Diazonium-salz — Carbonium-ion

Die mutagen wirkenden Metaboliten des DMN haben elektrophilen Charakter und können auf Grund dieser Eigenschaften mit der DNA interagieren. So ist z.B. bekannt, daß das Diazomethan, das unter anderem bei der Metabolisierung des DMN entsteht, im Gewebe Nukleinsäuren und Proteine methyliert (Montesano et al 1970). Da Nukleinsäuren mit methyliertem Guanin irreversibel zerfallen können (Lawley 1974), ist der Methylierung von Nukleinsäuren eine besondere Bedeutung für den kanzerogenen und mutagenen Effekt von DMN beizumessen. Auf Grund der großen Stabilität des

DMN, seiner geringen Toxizität und seiner Eigenschaft als indirekt wirksames Mutagen, konnte an Hand dieser Substanz die Praktikabilität des neu ins Testsystem von Chlamydomonas eingeführten metabolisierenden Systems eindeutig belegt werden.

Ebenso wie DMN ist auch Cyclophophamid ein indirekt wirkendes Mutagen. Eine Metabolisierung dieser Substanz ist notwendig, damit Cyclophosphamid seine mutagene Wirkung entfalten kann. Wie im Ergebnisteil dargelegt, kann eine mutagene Wirkung von Cyclophosphamid im Testsystem von Chlamydomonas nur in den Ansätzen mit metabolisierender Komponente nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Veröffentlichungen über die mutagene Wirkung von metabolisiertem Cyclophosphamid in E.coli (Ellenberger et al 1977), Salmonella typhimurium (Ellenberger et al 1975, Frederick et al 1984), Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces pombe (Basale et al 1983, Arni et al 1984). Auch bei diesen Testorganismen zeigte sich eine mutagene Wirkung des Cyclophophamid erst nach Metabolisierung. Besonders gut lassen sich die Ergebnisse, die im Chlamydomonassystem erhalten wurden, mit den Ergebnissen,die in eukaryotischen Testsystemen wie z.B. mit Saccharomyces cerevisiae erzielt wurden, vergleichen. Auch bei diesen Experimenten konnte eine lineare Abhängigkeit der mutagenen Wirkung von Cyclophosphamid von der eingesetzten Proteinmenge im S9-Mix festgestellt werden. Ebenso spielt die Inkubationszeit beim Nachweis der mutagenen Wirkung von Cyclophosphamid in diesem Testsystem, ebenso wie bei Chlamydomonas, eine wichtige Rolle. Eine sogenannte "lag-Phase" von zwei Stunden, in der keine mutagene Wirkung von Cyclophosphamid festgestellt werden konnte, machte eine längere Behandlungsdauer (16 Stunden) notwendig. Im Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem konnte ebenfalls erst nach einer längeren Behandlungsdauer (24 Stunden) die mutagene Wirkung von Cyclophosphamid belegt werden. Diese lange Inkubationszeit ist wahr-

scheinlich wegen der langsamen Penetration der Cyclophosphamidmetaboliten in die Zellen notwendig (Basale et al 1983). Daneben kann aber auch die weitere Bildung von mutagen wirkenden Metaboliten während dieses Zeitraums nicht ausgeschlossen werden, da bekannt ist, daß die Aktivierungskapazität des S9 über einen längeren Zeitraum hinweg substratspezifisch erhalten bleiben kann (v.d. Hude et al 1984).

Auch die Untersuchungen zur Toxizität von metabolisiertem Cyclophosphamid stimmen gut mit bekannten Literaturdaten überein (Sladek 1973). Der relativ geringen Toxizität von Cyclophosphamid in den Versuchsansätzen ohne S9-Mix stehen die hohen Toxizitätswerte von Cyclophosphamid nach Metabolisierung gegenüber (Tabelle 7 und 8).
Obwohl der genaue Mechanismus der toxischen Wirkung von Cyclophosphamid noch nicht geklärt ist, wird die Bildung von kovalenten Bindungen innerhalb eines DNA-Stranges, sowie zwischen zwei DNA-Strängen diskutiert (Fox et al 1980). Bifunktionelle Abbauprodukte von Cyclophosphamid, die stark toxisch wirken, werden aber nur bei enzymatischer Aktivierung gebildet. So entsteht aus Cyclophosphamid zunächst 4-Hydroxycyclophosphamid, das zu Phosphoramidmustard und Acrolein weiter zerfällt (Hales 1982). Die nur nach metabolischer Aktivierung beobachtete hohe Toxizität des Cyclophosphamids in Chlamydomonas ist ein weiterer Beleg für die Praktikabilität des erweiterten Algentestsystems.

Die Prüfung von Quercetin in Chlamydomonas reinhardii erbrachte negative Ergebnisse. Ebensolche Resultate wurden in verschiedenen anderen Testsystemen erzielt. So erbrachten die Prüfungen auf Reversion der lys, his und hom loci in Saccharomyces cerevisiae sowohl mit als auch ohne metabolisierendes System negative Ergebnisse (Hardigree 1978). Eine mutagene Wirkung der Testsubstanz konnte ebenfalls im Sporulationstest mit Bacillus subtilis nicht nachgewiesen werden (MacGregor et al 1979). Eine schwache mutagene

Wirkung wurde bei E.coli festgestellt (Hardigree et al 1978). Dem gegenüber steht die eindeutig mutagene Wirkung von Quercetin bei Salmonella typhimurium im Ames Test (Bjeldanes et al 1977), die auch durch eigene Untersuchungen bestätigt werden konnte. Zusätzlich zu den bekannten Literaturdaten konnte in den durchgeführten Experimenten eine, von der im S9-Mix enthaltenen Proteinkonzentration abhängige Steigerung der direkten mutagenen Wirkung von Quercetin belegt werden. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration im S9-Mix hatte,wie Abbildung 8 zeigt, eine vermehrte, dosisabhängige Induktion von Revertanten zur Folge.
Da Quercetin ein enoliertes Diketon ist, könnte Untersuchungen MacGregor et al (1978) zufolge, das "ultimative" Mutagen auf die Bildung eines Diketonoxidationsproduktes von Quercetin zurückzuführen sein. Wagner et al (1974) diskutieren die Möglichkeit, daß Quercetin zu Quinonoidverbindungen oxidieren kann und seine Dehydrierung zu instabilen, sehr reaktiven Quinonen führt. Eine von der eingesetzten Enzymmenge abhängige metabolische Umwandlung von Quercetin zu solchen Derivaten könnte somit für die erhöhte mutagene Wirkung nach S9-Mix Zugabe verantwortlich sein. Trotz all dieser Untersuchungen ist aber der genaue Mechanismus der mutagenen Wirkung von Quercetin noch nicht gesichert. Zudem kommen Hatcher et al (1985) bei ihren Untersuchungen zum Einfluß von S9-Mix auf die Mutagenität von Quercetin zu ganz anderen Schlußfolgerungen. Eine Metabolisierung von Quercetin durch im S9 enthaltene Enzyme wird dabei von diesen Autoren ausgeschlossen. In den von diesen Wissenschaftlern durchgeführten Experimenten konnte eine Autoxidation des Quercetins im Medium festgestellt werden. Dies hatte eine verminderte mutagene Wirkung der Testsubstanz zur Folge. Der Zusatz von S9-Mix hemmte bei diesen Versuchen die Autoxidation und führte so zu einer Erhöhung der mutagenen Aktivität des Quercetins. Eine von der eingesetzten Enzymmenge abhängige Hemmung dieser Reaktion könnte somit ebenfalls die vorliegenden Untersuchungsergebnisse in Salmonella typhimurium

erklären.
Vergleicht man die in den beiden mikrobiellen Testsystemen erzielten Ergebnisse miteinander, so steht der mutagenen Wirkung von Quercetin in Salmonella ein negatives Ergebnis, wie es auch in Pilzen gefunden wurde, in Chlamydomonas reinhardii gegenüber. Es ist daher wahrscheinlich, daß die verwendeten Chlamydomonasstämme zum Nachweis von Frame-Shift--Mutationen,wie sie durch Quercetin induziert werden, nicht geeignet sind. Auch andere Frame-Shift-Mutagene zeigen nach den bisherigen Untersuchungen in Chlamydomonas keine nennenswerten mutagenen Effekte (Bader 1980). Da auch an Hefen bisher nur sehr selten Frame-Shift-Mutationen nachgewiesen werden konnten (Brookes et al 1976), sind unter Umständen Eukaryoten generell weniger geeignet, diese Art der Mutation nachzuweisen.

Ebenso wie bei Quercetin erbrachten auch die vergleichenden Untersuchungen zur Mutagenität von ß-Asaron im Chlamydomonas/ Mikrosomen Testsystem ein negatives Ergebnis (Tabelle 12). Die erzielten Resultate im Salmonellasystem zeigen dagegen eine mutagene Wirkung der Testsubstanz nach Metabolisierung im Stamm TA 100. In keinem der übrigen getesteten Stämme von Salmonella typhimurium konnte jedoch darüber hinaus eine mutagene Wirkung von ß-Asaron nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, konnte aber eine Abhängigkeit der mutagenen Wirkung von ß-Asaron im Stamm TA 100 von der in den Versuchen eingesetzten Proteinmenge beobachtet werden. Der Testansatz mit der höchsten Proteinkonzentration im S9-Mix führte dabei zur Induktion der meisten Revertanten. Ebenfalls hat die Vorbehandlung der Versuchstiere,die zur Herstellung des S9 verwendet wurden, einen Einfluß auf die mutagene Wirkung von ß-Asaron (Tabelle 9). Der S9, der aus der Leber von unbehandelten Tieren gewonnen wurde, zeigte die geringste Kapazität mutagen wirkende Metaboliten von ß-Asaron zu bilden. Methylcholanthren, das in der Leber vor allem eine Erhöhung der P_{448} Aktivitäten bei den Monooxigenasen

bewirkt, erwies sich als der am schwächsten wirkende Induktor. Der Einsatz von S9, der von mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren stammte, das speziell auf die P_{450} Aktivitäten wirkt, hatte eine deutliche Erhöhung der Revertantenzahlen zur Folge. Eine weitere Steigerung der Mutagenität konnte beim Zusatz von S9, der von mit Clophen A 50 vorbehandelten Tieren gewonnen wurde, beobachtet werden. Clophen A 50 induziert sowohl P_{450} als auch P_{448} Aktivitäten. Die höchsten Revertantenzahlen pro Platte, die bei den Versuchen mit dieser Vorbehandlung beobachtet wurden, könnte man auf einen summierenden Effekt der induzierten Enzyme bei der Bildung der mutagen wirkenden Metaboliten zurückführen.
Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse in den zwei Testsystemen mit Untersuchungen von anderen Alkenylbenzolen in anderen mikrobiellen Testsystemen, so fällt auf, daß nur sehr wenige getestete Substanzen eine mutagene Aktivität in Salmonella typhimurium zeigen. Im E.coli System konnte bei diesen Untersuchungen für keine der untersuchten Substanzen eine mutagene Wirkung festgestellt werden (Sekizawa et al 1982). Untersuchungen zur Mutagenität von Alkenylbenzolen in eukaryotischen, mikrobiellen Testsystemen liegen,soweit mir aus der Literatur bekannt, nicht vor. Zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen lagen auch keine Befunde zur mutagenen Wirkung von ß-Asaron vor. Zwischenzeitlich jedoch kann man auch der Literatur Daten zur Mutagenität von ß-Asaron in Salmonella typhimurium entnehmen (Göggelmann und Schimmer 1983, Göggelmann, Robisch und Schimmer 1984). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden der vorliegenden Arbeit.

Über die Konstitution des "ultimativen" Mutagens und die Metabolisierung von ß-Asaron ist bis heute nichts bekannt. Aber die Befunde, daß die karzinogen wirkenden Alkenylbenzole wie z.B. Safrol und Estragol (Miller et al 1983) über eine Bildung von 1´- Hydroxyderivaten metabolisiert

werden, haben sich gehäuft (Miller et al 1982, Miller et al 1983). Bei der weiteren Metabolisierung zu elektrophilen Agentien ist die Bildung von Sulfatsäureestern von zentraler Bedeutung, wobei die Reaktionskinetik dieser Sulfatierung von einem optimalen Proteinlevel abhängig zu sein scheint (Randerath et al 1984, Phillips et al 1984). Auch für das noch nicht untersuchte ß-Asaron wäre ein derartiger Weg der Aktivierung denkbar. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß die Mutagenität von ß-Asaron in Salmonella sowohl von der Proteinkonzentration im S9-Mix als auch von der Induktion bestimmter Enzyme im S9 abhängig ist.
Für die negative Wirkung von ß-Asaron in Chlamydomonas können verschiedene Ursachen in Betracht kommen.So konnte Randerath et al (1984) schon relativ kurze Zeit nach Applikation der Testsubstanz ein schnelles Absinken der Alkenylbenzol-DNA-Adduktrate in der DNA von Leberzellen(weibliche CD-1 Mäuse) feststellen,für die sie Repairprozesse verantwortlich machten.Auch für Chlamydomonas wären solche Repairprozesse denkbar.Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Mutagen durch Zellwand und Cytoplasmamembran davon abgehalten wird,die DNA überhaupt zu erreichen.Auch besitzen die verwendeten Chlamydomonasstämme nicht das R-Faktor-Plasmid pKM 101,das den Stamm TA 100 auszeichnet und ihn erst sensibel für die mutagene Aktivität von ß-Asaron macht.

Als eine weitere Substanz wurde Aristolochiasäure vergleichenden Untersuchungen zur Mutagenität unterzogen. Aristolochiasäure zählt ebenso wie das bereits diskutierte 2-NF zu den Nitroaromaten. Die Versuchsergebnisse, die mit Aristolochiasäure im Chlamydomonas/Mikrosomen Test erzielt wurden, sind aber von den mit 2-NF beobachteten Resultaten sehr verschieden. Während für 2-NF eine mutagene Wirkung in Chlamydomonas nachgewiesen werden konnte, zeigte sich für Aristolochiasäure ein negatives Ergebnis in diesem Testsystem. In Salmonella dagegen konnte eine mutagene

Wirkung in den Stämmen TA 100 und TA 1537 beobachtet werden (Robisch et al 1982). Der Zusatz von S9-Mix hatte dabei keinen Einfluß auf die Mutagenität. Die Ergebnisse, die mit einem nitroreduktasedefizienten Stamm von Salmonella typhimurium, dem die "klassische" Nitroreduktase fehlt, erzielt wurden, stehen im Einklang mit Veröffentlichungen zur Mutagenität verschiedener anderer Nitroaromaten im bakteriellen Testsystemen (Rosenkranz et al 1983). Wie Abbildung 13 zeigt, konnte im Stamm TA 100 NR keine mutagene Aktivität von Aristolochiasäure beobachtet werden (Robisch et al 1983). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die Mutagenität von Aristolochiasäure von einer Reduktion der Nitrogruppe durch bakterieneigene Nitroreduktaseenzyme abhängig ist. Gleichlautende Ergebnisse liegen für eine Vielzahl von Nitroaromaten vor (Rosenkranz et al 1983). Dabei ist bemerkenswert, daß die einzelnen Nitroreduktaseenzyme sehr substratspezifisch wirken können und somit Enzymausstattung der Testorganismen für den Nachweis der mutagenen Wirkung des zu testenden Nitroaromaten von entscheidender Bedeutung ist.Gleiches gilt für die reduzierende Kapazität der im S9 enthaltenen Enzyme. Untersuchungen zur Mutagenität von Aristolochiasäure belegen, daß im Gegensatz zu verschiedenen anderen Nitroaromaten die im verwendeten S9 enthaltenen Enzyme nicht in der Lage sind die Nitrogruppe von Aristolochiasäure zu reduzieren (Schmeiser et al 1984). Obwohl nach den vorliegenden Ergebnissen der Reduktion der Nitrogruppe eine entscheidende Bedeutung für die mutagene Wirkung von Aristolochiasäure zuzukommen scheint, können auch noch andere Mechanismen für die biologische Aktivität dieser Substanz verantwortlich sein. Von einigen Nitroaromaten ist bekannt, daß sie zwischen die DNA-Basenpaare zu interkalieren vermögen (Rosenkranz et al 1983). Die mutagene Aktivität dieser interkalierenden Verbindungen ist ziemlich gering und kann von ihren Aktivitäten im Stamm TA 1537 abgeleitet werden. Bei diesen Interkalationen können natürlich die Substituenten einen Einfluß auf die

mutagene Wirkung der Testsubstanz ausüben. Es wurden deshalb Untersuchungen zur mutagenen Wirkung der Reinsubstanzen der verwendeten Aristolochiasäurecharge in Salmonella typhimurium durchgeführt.
Wie aus Abbildung 11 ersichtlich,wirken Aristolochiasäure I und Aristolochiasäure II ohne Metabolisierung im Stamm TA 100 mutagen. Im Stamm TA 1537 konnte jedoch nur für Aristolochiasäure II eine starke mutagene Wirkung festgestellt werden. Die sehr schwache mutagene Wirkung von Aristolochiasäure I im Stamm 1537, ein Stamm der Frame-Shift-Mutationen anzeigt, könnte auf hindernde sterische Effekte der Methoxygruppe zurückzuführen sein, die eine Interkalation dieser Substanz erschweren. Unterstützung findet diese Annahme durch die Tatsache, daß das nitrogruppenfreie Aristolactam I im Stamm TA 100 nicht wirkt und im Stamm TA 1537 eine vergleichbar schwache mutagene Wirkung wie die korrespondierende Aristolochiasäure I zeigt. Die beobachtete erhöhte Induktion von Revertanten in den Versuchsansätzen mit S9-Mix Zugabe bei der Prüfung von Aristolactam I, könnte auf eine Metabolisierung der Testsubstanz zu besser interkalierbaren Derivaten zurückzuführen sein. Den vorliegenden Befunden zufolge kann also nicht ausgeschlossen werden, daß eine reine Interkalation von Aristolochiasäure eine, wenn auch sehr geringe Rolle bei der mutagenen Wirkung der Testsubstanz spielt.

Für die unterschiedlichen Befunde zur Mutagenität von Aristolochiasäure in den beiden untersuchten Testsystemen müssen verschiedene Faktoren diskutiert werden. Neben Repairmechanismen und Permeabilitätsproblemen können auch zwei weitere Gründe für das negative Ergebnis in Chlamydomonas in Frage kommen. Zum einen eignet sich wie schon dargelegt Chlamydomonas anscheinend nicht zum Nachweis von Frame-Shift-Mutationen. Zum anderen besitzt Chlamydomonas offenbar nicht die Enzymausstattung, die speziell zur Reduktion der Nitrogruppe von Aristolochiasäure notwendig ist. Die im S9 enthaltenen Enzyme sind ebenso, wie die Versuche mit

NR-Stämmen von Salmonella zeigen, nicht in der Lage Aristolochiasäure zu mutagen wirkenden Agentien zu verstoffwechseln. Die beiden Nitroaromaten Aristolochiasäure und 2-NF benötigen, wie die vorliegenden Ergebnisse belegen, offenbar unterschiedliche Nitroreduktaseenzyme um metabolisch zu mutagen wirkenden Agentien umgewandelt zu werden.Unterstützung findet diese Annahme durch die Ergebnisse die nach S9-Mix Zugabe zu diesen beiden Testsubstanzen erzielt wurden. So konnte zwar durch die im S9-Mix vorhandenen Enzyme eine Steigerung der mutagenen Wirkung von 2-NF erzielt werden, auf die mutagene Wirkung von Aristolochiasäure hatten die selben Enzyme jedoch keinen Einfluß.

Die mit dem Furocumarin 5 MOP im Dunkeln erzielten Resultate zeigen eine Übereinstimmung der Ergebnisse in beiden Testsystemen. Sowohl im Salmonella/Mikrosomen - als auch im Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem wirkt 5 MOP im Dunkeln nicht mutagen. Diese Befunde stimmen mit Literaturdaten überein, die bei der Untersuchung des strukturverwandten 8 MOP im Dunkeln in Chlamydomonas und in Salmonella erzielt wurden. Auch für 8 MOP konnte eine direkte Wirkung im Dunkeln sowohl in Chlamydomonas (Schimmer et al 1977) als auch in Salmonella (Scott 1976,Kirkland et al 1983) nicht nachgewiesen werden. Es liegen aber auch widersprüchliche Literaturdaten zu diesen Ergebnissen aus bakteriellen Testsystemen vor (Bridges et al 1977, Clarke et al 1975). Auch für das noch weniger untersuchte 5 MOP sind in der Literatur widersprüchliche Daten zu finden.So konnte Ashwood-Smith et al (1980) Frame-Shift-Mutationen in E.coli durch 5 MOP im Dunkeln auslösen, während in Salmonella von Quinto et al (1984) keine direkte mutagene Wirkung von 5 MOP im Dunkeln festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu anderen Furocumarinen,die im Dunkeln nach Metabolisierung mutagen in Salmonella (Tamaro et al 1981) und E.coli (Kirkland et al 1983) wirken, findet eine Umwand-

lung zu mutagen wirkenden Metaboliten von 5 MOP durch S9-Mix Zugabe nicht statt. Wie aus Tabelle 21 und 22 ersichtlich hat die Zugabe eines metabolisierenden Systems keine mutagene Wirkung von 5 MOP in beiden Testsystemen zur Folge.
Konnte im Algensystem im Vergleich zum Bakteriensystem eine mutagene Wirkung von Quercetin,ß-Asaron und Aristolochiasäure nicht gezeigt werden, so erwies sich Chlamydomonas als ausgezeichneter Testorganismus zum Nachweis der mutagenen Wirkung von 5 MOP + UV-A. Da eine direkte mutagene Wirkung von 5 MOP + UV-A in Chlamydomonas seit einiger Zeit bekannt ist (Schimmer 1981), stand bei den durchgeführten Untersuchungen der Einfluß der exogenen metabolisierenden Komponente im Mittelpunkt des Interesses. Wie Abbildung 14 zeigt, führten die Experimente, die mit S9--Mix im Versuchsansatz durchgeführt wurden, zu einer signifikanten Erniedrigung der Reversionsrate. Übereinstimmende Ergebnisse konnten auch bei E.coli beobachtet werden (Pool et al 1982). Auch in Experimenten mit diesen Testorganismen konnte eine Deaktivierung von 5 MOP durch S9-Mix belegt werden. Zudem liegen qualitative Untersuchungen vor, die eine Inaktivierung des ähnlich gebauten Furocumarins 8 MOP durch mikrosomale Enzyme zeigen konnten (Fischer 1980). Untersuchungen zum Einfluß der Enzymkonzentration im S9-Mix konnten nachweisen, daß die Reduktion der durch 5 MOP + UV-A induzierten Reversionsraten von der im S9-Mix eingesetzten Enzymmenge abhängig ist. Der S9--Mix mit der höchsten Enzymkonzentration führt dabei zur stärksten Reduktion der mutagenen Wirkung von 5 MOP + + UV-A. Eine Metabolisierung der Testsubstanz zu weniger bzw. nicht mutagen wirkenden Metaboliten ist diesen Befunden nach denkbar. Eine komplette, nicht spezifische Bindung des Mutagens an im S9-Mix enthaltene Enzyme konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden. Diese, ohne NADP im S9-Mix durchgeführten Versuche, waren so ausgelegt, daß eine exogene Metabolisierung nicht statt-

finden konnte. Wie aus Tabelle 21 zu entnehmen ist, konnte in diesen Versuchen nur eine geringe, nicht signifikante, Erniedrigung der Reversionsraten beobachtet werden. Diese geringe Erniedrigung ist möglicherweise entweder auf den Einfluß, ohne den Zusatz eines exogenen NADP erzeugenden Systems, aktiver Enzyme im S9, auf eine geringe Interaktion von 5 MOP mit Proteinen oder auf eine teilweise Absorption den UV-A durch den S9 und somit einer verminderten Bestrahlungsstärke zurückzuführen.

Untersuchungen zum Metabolismus von Furocumarinen in vivo an Ratten, Hunden und am Menschen konnten nachweisen, daß die gebildeten Metabolite keinen intakten Furanring mehr besitzen (Busch et al 1978, Kolis et al 1979). Diese Metabolite können zwar noch in der Lage sein photochemisch mit der DNA zu reagieren, sie sind aber nur mehr fähig Monoadukte zu bilden. Von diesen aber ist bekannt, daß sie in Chlamydomonas keine Mutationen zu induzieren vermögen (Schimmer et al 1980). Der aus Rattenleber gewonnene S9 scheint den vorliegenden Untersuchungen zufolge in der Lage zu sein, eine Metabolisierung zu ähnlichen Produkten, wie sie auch in vivo nachgewiesen wurden, durchführen zu können.
Eine Bestrahlung mit UV-A, die ja in anderen Testsystemen erst zu einer mutagenen Wirkung verschiedener Furocumarine führt, scheint wie im Ergebnisteil bereits dargelegt, für den Einsatz im Ames-Test nicht geeignet zu sein. Auf Grund der großen biologischen Aktivität der UV-A Bestrahlung allein treten schon bei Bestrahlungszeiten von 4 Minuten toxische Effekte auf. Diese Toxizität wird am sogenannten Background sichtbar. Hervorgerufen wird dieser durch die Histidinmenge im Toparar. Diese Menge ist so berechnet, daß 10^7 bis 10^8 Keime pro ml Bakterienkultur einige Teilungsschritte durchführen können. Dadurch werden mikroskopisch kleine Kolonien gebildet, die einen milchigen Hintergrund auf der Platte verursachen. Sinkt die Gesamtzahl der Bakterien auf

Grund toxischer Effekte unter 10^6 Keime pro ml Bakterienkultur, so wird der Quotient Histidin/Keim so stark verändert, daß sich sichtbare Kolonien bilden können. Dadurch werden falsch positive Befunde vorgetäuscht. Dieses Phänomen konnte bereits auf den bestrahlten Kontrollplatten beobachtet werden. Eine aussagerichtige Auswertung der Versuche war somit nicht mehr gegeben. Eine Erhöhung der Bestrahlungszeit auf einen Wert von über 10 Minuten führte darüber hinaus zum völligen Absterben der Bakterien. Diese Befunde stehen im Einklang mit Literaturdaten, die eine bakterizide Wirkung einer PUVA-Behandlung sowohl für Salmonella als auch für andere Bakterien wie z.B. Bacillus subtilis und Escherichia coli berichten (Song et al 1979). Vor allem repairdefekte Bakterien, zu denen auch die verwendeten Salmonellastämme zählen, reagieren auf eine Behandlung mit 5 MOP + UV-A mit einer hohen Absterbrate (Pool 1981). Zieht man zudem noch in Betracht, daß die UV-A Bestrahlung allein appliziert auch schon mutagen in Salmonella wirkt (Leyden et al 1981, MacPhee et al 1985) und dies in Chlamydomonas nicht der Fall ist, ist das eukaryotische Testsystem für die Untersuchungen zur mutagenen Aktivität von 5 MOP + UV-A besser geeignet.

Mit der Weiterentwicklung des Algensystems durch eine Einführung einer metabolisierenden Komponente in das Testsystem konnte die Aussagekraft dieses Mutagenitätstestes bedeutend erhöht werden. An Hand von Alkylantien war die Praktikabilität dieser Erweiterung eindeutig belegbar. Mit dem Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem steht nun ein Test zur Verfügung, mit dem auch indirekt wirksame Mutagene nachgewiesen werden können. Vergleichende Untersuchungen mit dem Salmonella/Mikrosomen Testsystem zeigen aber auch auf, daß das Algensystem noch weiter optimiert werden kann. Da die verwendeten Chlamydomonasstämme bis auf den genetischen Marker, im Gegensatz zu den verwendeten Salmonellastämmen, keine weiteren Mutationen in sich tragen, könnte

man die Empfindlichkeit gegenüber Mutagenen durch Entwicklung spezieller Mutanten noch steigern. So ist z.B. bekannt, daß Chlamydomonas über Repairmechanismen verfügt (Rosen et al 1980), repairdefekte Mutanten von Salmonella aber diese Organismen erst für bestimmte Mutagene empfindlich machen. Ebenso besitzt Chlamydomonas im Gegensatz zu Salmonella eine intakte Zellwand (Lewin 1976). Zellwände aber stellen ein Hindernis für bestimmte mutagen wirkende Substanzen dar (Ames et al 1972).

Man sollte aber das Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem nicht überbewerten, denn es bleibt zu bedenken, daß bisher nur bestimmte Mutagene (vor allem Alkylantien) in diesem Testsystem gut erkennbar sind und zudem bisher noch kein einziger Vertreter aus der großen Gruppe der Frame-Shift-Mutagene in Chlamydomonas nachgewiesen werden konnte. Andererseits ist für Chlamydomonas von Vorteil, daß Algen einen besonderen phototrophen Metabolismus und ein anderes Spektrum an Enzymen besitzen wie Bakterien (Lewin 1976). Eine andere Enzymausstattung wie sie bei Prokaryonten vorliegt, könnte sich aber möglicherweise günstig auf noch zu entdeckende "Mutagene" auswirken.

Es wird deshalb angeregt, das Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem als Ergänzung zu anderen Testsystemen in sogenannten Testbatterien mit aufzunehmen. Vor allem im Zuge der immer weiter um sich greifenden Umweltbelastungen würden sich diese Organismen vielleicht,vor allem bei Gewässeruntersuchungen als geeignete Testorganismen anbieten.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte die Einführung einer exogenen metabolisierenden Komponente im Testsystem von Chlamydomonas und vergleichende Untersuchungen zur Mutagenität ausgewählter Testsubstanzen in einem pro- und einem eukaryotischen Genmutationstestsystem zum Inhalt. Für den Nachweis der Praktikabilität des erweiterten Algensystems wurden alkylierende Agentien, die als sogenannte Positivkontrollen aus anderen Testsystemen bekannt sind, eingesetzt.

Die direkt wirksamen Mutagene ENU und 2-NF, sowie die indirekt wirksamen Mutagene DMN und Cyclophosphamid wurden im Chlamydomonas/Mikrosomen Testsystem geprüft. Durch diese Substanzen konnten erstmals auch in Chlamydomonas toxische und mutagene Effekte induziert werden, wie sie von diesen Substanzen auch aus anderen Testsystemen bekannt waren. Dabei zeigte sich, daß die Mutagenität von ENU in Chlamydomonas nicht durch die im S9-Mix enthaltenen Enzyme beeinflußt wird. Eine Steigerung der Mutagenität von 2-NF durch das zugesetzte exogene metabolisierende System konnte jedoch beobachtet werden. DMN und Cyclophosphamid wirken nur nach exogener Aktivierung in Chlamydomonas mutagen. Die toxischen Befunde von Cyclophosphamid nach Zugabe von S9-Mix lassen sich durch eine enzymatische Aktivierung des Cyclophosphamids erklären.

Eine mutagene Wirkung von Quercetin in Chlamydomonas konnte nicht gefunden werden. Dagegen ist Quercetin ein wirksames Mutagen mit Frame-Shift-Aktivitäten im Salmonella/Mikrosomen Test. Der Zusatz von S9-Mix konnte eine von der eingesetzten Enzymmenge abhängige Steigerung der mutagenen Wirkung der Testsubstanz nachweisen.

Auch für ß-Asaron konnte in Chlamydomonas keine mutagene Wirkung festgestellt werden. Im Salmonella/Mikrosomen Test dagegen wirkt ß-Asaron nach Metabolisierung im Stamm TA 100 mutagen. Die Mutagenität dieser Substanz ist abhängig von der Vorbehandlung der für die S9 Gewinnung verwendeten Ratten und der im S9-Mix enthaltenen Enzymmengen.

Aristolochiasäure wirkt in Chlamydomonas ebenfalls nicht mutagen. In Salmonella dagegen konnte eine direkte mutagene Wirkung dieser Substanz festgestellt werden. Die mutagene Wirkung von Aristolochiasäure ist dabei von einer Reduktion der Nitrogruppe durch bakterieneigene Nitroreduktaseenzyme abhängig. Auch die Reinsubstanzen Aristolochiasäure I, Aristolochiasäure II und Aristolactam I sind wirksame Mutagene in Salmonella typhimurium.

Bergapten wirkt im Dunkeln sowohl im Algen- als auch im Bakteriensystem nicht mutagen. Die mutagene Wirkung von 5 MOP + UV-A in Chlamydomonas konnte durch das exogene metabolisierende System proteinabhängig erniedrigt werden. Der Einsatz von 5 MOP + UV-A wirkte bei Salmonella typhimurium stark toxisch.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Chlamydomonas/Mikrosomen Test für bestimmte Mutagene (Alkylantien) als Indikator brauchbar ist und eine sinnvolle Ergänzung in Testbatterien darstellen kann.

6.Literaturverzeichnis

Ames B.N., P. Sims, P.L. Grover
Epoxides of carcinogenic polycyclic hydrocarbons are frame-shift mutagens
Science 176 (1972), 47 - 49

Ames B.N., J. McCann, E. Yamasaki:
Methods for detecting carcinogenes with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test
Mut. Res. 31 (1975), 347 - 364

Arenaz P., B.K. Vig:
Somatic crossing-over in Glycine max (L) merrill:
Activation of dimethyl nitrosamine by plant seeds and comparision with methyl nitrosurea in inducing somatic mosaicism
Mut. Res. 52 (1978), 367 - 380

Arni P., A. Chetelat, U. Friederich, D. Hann:
Mutagenicity Test on Saccharomyces cerevisiae D7:
Cooparative Studies of Reproducibility, Sensitivity and Specifity
in: Arni P. and A. Basler (eds): Mutagenicity Testing of Chemicals Using Microbial Testsystems
MvP Hefte (1984), 207 - 214

Arnold C.G.:
The induction of extrakaryotic mutations
in: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man
Vogel F., Röhrborn G. (eds) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970), 285 - 293

Arnold C.G.:
Gene außerhalb des Zellkerns
Biol. in uns. Zeit 1 (1971), 111 - 121

Ashby J.:
Screening chemicals for mutagenicity: practies and pitfalls
in: Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology
Academic Press (1982), 1 - 33

Ashwood-Smith M.J., G.A. Plouton, M. Barker, M. Mildenberger:
5-Methoxypsoralen, an ingredient in several suntan preperations has letal, mutagenic and clastogenic properties
Nature 285 (1980), 407 - 409

Bader U.:
Photo-oxidationsprodukte von Benzo(a)pyren:
Untersuchungen zur Stabilität sowie zur Kanzerogenität im Ciliaten-Phototoxizitätstest und im Chlamydomonas-Mutagenitätstest
Dissertation (1980), Universität Erlangen-Nürnberg

Bartfeld H.:
Immunologische Untersuchungen zum Nachweis der abwehrsteigernden Wirkung von Aristolochiasäure
Arzneimittelforsch. 27 (1977), 2297 - 2298

Bartsch H., B. Terracini, C. Mallaveile, L. Tomatis, J. Wahrendorf, G. Braun, B. Dodet
Quantitative comparison of carcinogenicity, mutagenicity and electrophilicity of 10 direct-acting alkylating agents and of the initial O^6: 7-alkylguanine ratio in DNA with carcinogenic potency in rodents
Mut. Res. 110 (1983), 181 - 219

Basale R., D. Rusciano, G. Stretti, D. Zucconi, M. Monaco, P. Mosesso, P. Principe
The induction of forward gene mutations and gene conversion in yeasts by treatment with cyclophosphamidein vitro and in vivo
Mut. Res. 111 (1983), 295 - 312

Behn W., C.G. Arnold:
Unterschiedliche genetische Konstitution von Chloroplast und Mitochondrien bei antibiotikaabhängigen Mutanten von Chlamydomonas reinhardii
Protoplasma 82 (1974), 91 - 101

Bonse G., M. Metzler:
Biotransformation organischer Fremdsubstanzen
Georg Thieme Verlag (1978), Stuttgart

Borrmann S.:
Untersuchungen zur Mutagenität von N-Methyl-N´-nitro-N-nitrosoguanidin und N-Ethyl-N-nitrosurea in Chlamydomonas reinhardii
Diplomarbeit (1985), Universität Erlangen-Nürnberg

Bridges B.A., R.P. Mottershad:
Frameshift mutagenesis in bacteria by 8 MOP in the dark
Mut. Res. 44 (1977), 305 - 312

Bowman W.C., M.J. Rand:
Oncogenesis
in: Textbook of Pharmacology, 2. Edition, Blackwell Scientific Publications (1980), Oxford, London, Edinburgh, Melbourne

Brown J.P.:
A review of the genetic effects of naturally occuring flavonoids, anthraquinones and related compounds
Mut. Res. 75 (1980), 243 - 277

Brookes P., F.J. De Serres:
Report of the workshop on the mutagenicity of chemical carcinogens
Mut. Res. 38 (1976), 155 - 160

Brusick D., H. Andrews:
Comparison of the genetic activity of dimethylnitrosamin, ethylmethanesufonate, 2-acetylaminofluorene and ICR-170 in Saccharomyces cerevisiae strains D3, D4 and D5 using in vitro assays with and without metabolic activation
Mut. Res. 26 (1974), 491 - 500

Bundesgesundheitsamt:
Zum Zulassungswiderruf aristolochiasäurehaltiger Fertigarzneimittel
Pharm. Z. 126 (1981), 1373 - 1374

Busch U., J. Schmid, F.W. Koss, H. Zipp, A. Zimmer:
Pharmacokinetics and metabolic- pattern of 8MOP in man following oral administration as compared to pharmacokinetics in rat and dog
Arch. Dermatol. Res. 262 (1978), 255 - 265

Byeldanes L.F., G.W. Chang:
Mutagenic Activity of Quercetin and Related Compounds
Science 197 (1977), 577 - 578

Carver J.H., A.V. Carrano, J.T. MacGregor:
Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol and galangin on chinese hamster ovary cells in vitro
Mut. Res. 113 (1983), 45 - 60

Clarke C.H., M.J. Wade:
Evidence that caffeine, 8 MOP and steroidal diamines are frameshift mutagens for E.coli K12
Mut. Res. 28 (1975), 123 -125

Dall`Acqua F., S. Marciani, F. Zamban, G. Rodighiero:
Kinetic analysis of the photoreaction (365 nm) between psoralen and DNA
Photochem. Photobiol. 29 (1979), 489 - 495

Dean B.J., P. Hodges:
Short-term tests for genotoxicity
in: Proceedings of the Frame Symposium on Animals and Alternatives in Safety Evaluation, London, (1982)

de Kok A.J., P. de Knijff, G.R. Mohn:
Correlation between the stability of ethyl nitrosurea in aqueous solutions at different pH and temperature and its mutagenic effectiveness for Salmonella typhimurium strain TA 100
Mut. Res. 120 (1983), 81 - 89

De Serres F.J., H.V. Malling:
Measurement of recessive lethal damage over the entire genome and at two specific loci in the ad-3 region of Neurospora crassa with a two component heterokaryon

in: Chemical Mutagens, Vol. 2, Hollaender, A. (ed)
Plenum Press, New York, London (1971), 311 - 341

De Serres F.J.:
Mutagenicity of chemical carcinogens
Mut. Res. 41 (1976), 43 - 50

El-Bayoumy, S.S. Hecht:
Identification and Mutagenicity of Metabolites of 1-Nitropyrene formed by rat liver
Cancer Res. 43 (1983), 3122 - 3137

Ellenberger J., G.R. Mohn:
Mutagenic activity of cyclophosphamide, isosfamide and trofosfamide in different genes of E.coli and Salmonella typhimurium after biotransformation through extract of rodent liver
Arch. Toxicol. 33 (1975), 225 - 240

Ellenberger J., G.R. Mohn:
Mutagenic activity of major mammalian metabolites of cyclophosphamide towards several genes of Escherichia coli
J. Toxicol. Environ. Health 3 (1977), 637 - 650

Fischer K.:
Inaktivierung von Xanthotoxin durch mikrosomale Enzyme
Zulassungsarbeit (1980), Universität Erlangen-Nürnberg

Fleer R., A. Ruhland, M. Brendel:
The cytotoxic action of activated and non-activated cyclo-

phosphamide in yeast: comparison of induced DNA damage
Chem.-Biol. Interact. 42 (1982), 67 - 78

Fox M., D. Scott:
The genetic toxicology of nitrogen and sulphur mustard
Mut. Res. 75 (1980), 131 - 168

Frederick K.A., J.G. Babish:
In vitro activation of the promutagenes 2-Acetamidofluorene, Cyclophosphamide and 7,12-Dimethylbenzanthtracene by constitutive Ferret and Rat hepatic S9 Fractions
Toxicology 31 (1984), 73 - 86

Gatehouse D.:
Detection ofmutagenic derivates of Cyclophosphamide and a variety of other mutagenes in a "microtitre"^{R} fluctuation test without microsomal activation
Mut. Res. 53 (1978), 289 - 296

Gebhart E.:
Chemische Mutagenese
G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, (1977)

Gichner T., J.Veleminsky, A.G. Undenbrink:
Induction of somatic mutations by the promutagenes dimethylnitrosamine in hairs of Tradescantia stamen
Mut. Res. 78 (1980), 381 - 384

Gichner T., J. Veleminsky:
Genetic effects of N-methyl-N`-nitro-N-nitroso-guanidine

and its homologs
Mut. Res. 99 (1982), 129 - 242

Gillham N.W.:
Induction of chromosomal and non-chromosomal mutations in Chlamydomonas reinhardii with N-methyl-N`-nitro-N-nitrosoguanidine
Genetics 52 (1965), 529 - 537

Göggelmann W., O. Schimmer:
Mutagenicity testing of ß-Asaron and commercial calamus drugs with Salmonella typhimurium
Mut. Res. 121 (1983), 191 - 194

Göggelmann W., G. Robisch, O. Schimmer:
Mutagenicity screening of calamus drugs
Abstracts of posters presented at the 13th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, (1983) Montpellier
Mut. Res. 130 (1984), 165 - 263

Grant El, R.C. von Borstel, M.J. Ashwood-Smith:
Mutagenicity of Cross-Links and Monoadducts of Furocumarins (Psoralen and Angelicin) Induced by 360 nm Reaction in Excision-Repair-Defective and Radiation-Insensitive Strains of Saccharomyces cerevisiae
Environ. Mutag. 1 (1979), 55 - 63

Gross M.A., W.J. Jones, E.L. Cook, C.C. Bone:
Carcinogenicity of oil of calamus
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 8 (1970), 24

Habermann R.T.:
Project P-155-70
Report of the Food and Drug Administration (1971)

Hales B.F.:
Comparison of the Mutagenicity and Teratogenicity of Cyclophosphamide and its active Metabolites 4-Hydroxycyclophosphamide, Phosphoramide Mustard and Acrolein
Cancer Res. 42 (1982), 3016 - 3021

Harborne J.B., T.J. Mabry, H. Mabry (eds):
The Flavonoids
Academic Press, New York, (1975)

Hardigree A.A., J.L. Epler:
Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial systems
Mut. Res. 58 (1978), 231 -239

Hatcher J.F., G.T. Bryan:
Factors effecting the mutagenic activity of quercetin for Salmonella typhimurium TA 98: metal ions, antioxidants and pH
Mut. Res. 148 (1985), 13 - 23

Hawks B.G., R.W. Lee:
Methyl methanesulfonate mutagenesis of synchronized Chlamydomonas
Mut. Res. 37 (1976), 221 - 228

Herrmann K.:
Flavonols and flavonoids in food plants: A review
J. Food Technol. 11 (1976), 433 - 448

Hince T.A., S. Neale:
A comparison of the mutagenic action of the methyl and ethyl derivates of nitrosamides and nitrosamidines on Escherichia coli
Mut. Res. 24 (1974), 383 - 387

Hollstein M., J. McCann:
Short-term tests for carcinogens und mutagens
Mut. Res. 65 (1979), 133 - 226

v.d. Hude W., S. Fenselau, M. Scheutwinkel-Reich:
Investigations on the Stability of the S9-Fraction
in: Mutagenicity Testing of Chemicals Using Microbial Test Systems
MvP 3 (1984), 52 - 55

Karpinsky G.E., H.S. Rosenkranz:
The anaerob-mediated mutagenicity of 2-Nitrofluorene and 2-Aminofluorene for Salmonella typhimurium
Environ. Mutagenesis 2 (1980), 353 - 358

Kirkland D.J., K.L. Creed, P. Manisto:
Comparative bacterial mutagenicity studies with 8-methoxy-psoralen and 4,5',8-trimethylpsoralen in the presence of near-ultra-violet light and in the dark
Mut. Res. 116 (1983), 73 - 82

Knox P.:
Carcinogenic nitrosamides and cell cultures
Nature 259 (1976), 671 - 673

Kolis S.J., T.H. Williams, E.J. Postma, G.J. Sasso
P.N. Confalone, N.A. Schwartz:
The metabolism of ^{14}C-methoxalen by the dog
Drug Metab. Dispos. 7 (1979), 220 - 225

Lawley P.D.:
Some aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis
Mut. Res. 23 (1974), 283 - 295

Lawley P.D., A. Warren:
Specific excession of ethylated Purin from DNA of E.coli treated with N-Ethyl-N-Nitrosurea
Chem. Biol. Interact. 11 (1975), 55 - 57

Lewin R.A. (ed):
The Genetics of Algae
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne (1976)

Leyden M.F., K.L. Schoeffel, D.G. MacPhee:
Ultraviolet-induced frameshift mutagenesis in Salmonella typhimurium:absence of an effect of mutation frequency decline
Mut. Res. 84 (1981),247-255

Loppes R.:
Effect of the selective medium on the manifestation of mutations induced with mono-alkylating agents in Chlamydomonas reinhardii
Mut. Res. 7 (1969), 25 - 34

Loppes R., R. Matagne, P.J. Strijkert
Complementation of the Arg-7 locus in Chlamydomonas reinhardii
Heredity 28 (1972), 239 - 251

Loprino N., R. Barale, C. Bauer, S. Baroncelli, G.Bronzetti, A. Cammellini, A. Cinci, G. Corsi, G. Leporini, R. Nieri, M. Nozzolini, C. Serra:
The use of different testsystems with yeasts for the evaluation of chemically induced gene conversions and gene mutations
Mut. Res. 25 (1974), 197 - 217

MacGregor J.T., L.E. Sacks:
The sporolations system of Bacillus subtilis as the basis of a multigene mutagen test system
Mut. Res. (1976), 271 - 286

MacGregpr J.T., C. Jurd:
Mutagenicity of plant flavonoids; Structural requirements for mutagenic activity in Salmonella typhimurium
Mut. Res. 54 (1978), 297 - 309

MacGregor J.T., L.E. Sacks:
The Bacillus subtilis multigene sporulation test:

Sensitivity to known mutagens and carcinogens
Environ. Mutagen. 1 (1979), 121 - 131

MacPhee D.G., M.F. Leyden:
Effects of caffeine on ultraviolet-induced base-pair substitution and frameshift mutagenesis in Salmonella
Mut. Res. 143 (1985), 1 - 3

Madlé S., G. Obe:
Methods for analysis of the mutagenicity of indirect mutagens/carcinogens in eukaryotic cells
Hum. Genet. 56 (1980), 7 - 20

Malling H.V.:
Mutagenicity of two potent carcinogens, dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine in Neurospora crassa
Mut. Res. 3 (1966), 537 - 540

Malling H.V.:
Mutagenic activation of DMN and DEN in the Host-mediated assay and the microsomal system
Mut. Res. 26 (1974), 465 - 472

Margison G.P., P.J. O´Connor:
Nucleic acid modification by N-nitrosocompounds
in: Grover P.L. (ed) Chemical Carcinogens and DNA
CRC Press, Inc. Bota Raton, Florida (1979), 112 - 159

Maron D.M., B.N. Ames:
Revised methods for the Salmonella mutagenicity test
Mut. Res. 113 (1983), 173 - 215

Mayer C.W., C.J. Hybner, D.J. Brusick:
Genetic effects induced in Saccharomyces cerevisiae by Cyclophosphamide in vitro without liver enzyme preparation
Mut. Res. 37 (1976), 201 - 212

McCann J., E. Chai, E. Yamasaki, B. Ames:
Detection of carcinogens an mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals
Proc. Nat. Acad. Sci. 72 (1975), 5135 - 5139

McCoy E.C., E.J. Rosenkranz, H.S. Rosenkranz, R. Mermelstein:
Nitrated Fluorene Derivates are potent frame-shift mutagens
Mut. Res. 90 (1981), 11 - 20

McCoy E.C., H.S. Rosenkranz, R. Mermelstein:
Evidence for the existence of a family of bacterial nitroreductases capable of activating nitrated polycyclics to mutagens
Environ. Mutagen. 3 (1981), 421 - 427

McCoy E.C., M. Anders, H.S. Rosenkranz, R. Mermelstein:
Apparent absence of recombinogenic activity of nitropyrens for yeast
Mut. Res. 116 (1983), 119 - 127

McCoy E.C., G. de Marco, E.J. Rosenkranz, M. Anders, H.S. Rosenkranz:
5-Nitroacennaphtene: A newly recognized role for the nitrofunction in mutagenicity
Environ. Mutagen. 5 (1983), 17 - 22

McCoy E.C., M. Anders, H.S. Rosenkranz:
The basis of insensitivity of Salmonella typhimurium strain TA 98/1,8-DNP_6 to the mutagenic action of nitroarenes
Mut. Res. 121 (1983), 17 - 23

McCoy E.C.:
Role of Metabolism on the Mutagenicity of Nitroarenes
in: Biochemical Basis of chemical Carcinogens
H. Greim , R. Jung, M. Kramer, H. Marquard, F. Oesch (eds)
Raven Press, New York (1984), 57 - 67

Mendoza-Figuera T., R. Lopes-Revilla, S. Villa-Trevino:
DNA breaks induced by micromolar concentrations of dimethyl-nitrosamine in liver primary cell cultures from untreated and phenobarbital treated rats
Toxicology 27 (1983), 55 - 64

Mengs U., W. Lang, J.A. Poch:
The carcinogenic action of Aristolochic-Acid in rats
Arch. Toxicol. 51 (1982), 107 - 119

Mengs U.:
On the histopathogenesis of rat forestomach carcinomas caused by Aristolochic-Acid
Arch. Toxicology 52 (1983), 209 - 220

Miller E.C., J.A. Miller:
The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations problems and interpretations
in: Hollaender A. (ed): Chemical mutagens. Principles and methods for their detection
Plenum Press, New York, London (1971), 83 - 119

Miller J.A., E.C. Miler, D.H. Phillips:
The metabolic activation and carcinogenicity of alkenylbenzenes that occur naturally in many spices
in: Stich, H. F. (ed) Carcinogens and Mutagens in the Environment
CRC Press Inc. Boca Raton, Fl (1982), Vol. 1, 83 - 96

Miller E.C., A.B. Swanson, D.H. Phillips, T.L. Fletcher, A. Liem, J.A. Miller:
Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occuring and synthetic alkenylbenzene derivates related to safrole and estragole
Cancer Res. (1983), 1124 - 1134

Mix D.B., H. Guinaudeau, M. Shamma:
The aristolochic acids and aristolactams
J. Natural. Prod. 45 (1982), 657 - 666

Mohn G.R., J. Ellenberger, P.J. von Bladeren:
Evaluation and relevance of Escherichia coli test systems for detecting and for characterizing chemical carcinogens and mutagens
in: Williams G.M. (ed): Applied Methods in Oncology
Biomedical Press, Amsterdam (1980), Vol. 3, 27 - 41

Mohn G.R.:
The DNA Repair Host-Mediated assay as a convenient procedure for quantifying genotoxic factors present in various organs of chemically treated mice
in: P. Arni and A. Basler (eds): Mutagenicity Testing of Chemicals Using Microbial Test System
MvP Hefte 3 (1984), 33 - 46

Montesano R., P.N. Magee:
Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices in vitro
Nature 228 (1970) 173 - 174

Möse J.R., G. Lukas:
Versuche über die Wirkungsweise von Aristolochia clematitis L
Drug Res. 11 (1961), 33 - 36

Möse J. R.:
Versuche über die Wirksamkeit von Aristolochiasäure
Planta Med. 11 (1963), 72 - 91

Möse J.R., D. Stünzer, M. Zirm, Ch. Egger-Brüssing, F. Schmahl:
Experimentelle Beeinflussung der Herpes-simplex-Infektion des Kaninchenauges durch Aristolochiasäure
Drug Res. 30 (1980), 1571 - 1573

O`Brien S.J.:
Genetic Map 2
Lab of Viral Carcinogenesis NCI, NAI, Frederick (1982)

Pascher A.:
Über die Kreuzung einzelliger haploider Organismen: Chlamydomonas
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 34 (1916), 228 - 242

Pasternak L.:
Mutagene Wirkung von Dimethylnitrosamin bei Drosophila

melanogaster
Naturwissensch. 49 (1962), 381

Pederson T.C., J.S. Siak:
Mutagenic activation of nitro-PAH by microsomal and cytosolic enzymes
Soc. Toxicol. Abstract. Ann. Mutagen (1982), 49

Pfeifer S., H. Borchert:
Pharmakokinetik und Biotransformation
Eine Einführung
VEB Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin (1980)

Phillips D.H., M.V. Reddy, K. Randerath:
^{32}P-Post-labelling analysis of DNA adducts formed in the liver of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes
II Newborn male B6C3F$_1$ mice
Carcinogenesis 12 (1984), 1623 - 1628

Pool B.L.:
Biological activity of Psoralens in short term tests
Proc. Int. Psoralens, SIR (1981), 295 - 302

Pool B.L., R. Klein, R.P. Deutsch-Wenzel:
Genotoxicity of 5MOP and near ultraviolet light in repair--deficient strains of Escherichia coli WP2
Fd. Chem. Toxic. 20 (1982), 177 - 181

Preidel A.:
Entwicklung und Evaluierung eines Testsystems zur Untersuchung der rekombinogenen Potenz mutagener Substanzen in Chlamydomonas reinhardii
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg (1984)

Prival M.J., V.D. King, A.T. Sheldon jr:
The mutagenicity of dialkyl nitrosamines in the Salmonella plate assay
Environ. Mutagen. 1 (1979), 95 - 104

Quinto I., D. Averbeck, E. Moustacchi, Z. Hrisoho, I. Moron:
Frameshift mutagenicity in Salmonella typhimurium of furocoumarins in the dark
Mut. Res. 136 (1984), 49 - 54

Randerath K., R.E. Haglund, D.H. Phillips, M.V. Reddy:
^{32}P-Post-labelling analysis of DNA adducts formed in the liver of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes
I Adult female CD-1 mice
Carcinogenesis 12 (1984), 1613 - 1622

Ranneberg H., C.G. Arnold:
Die Wirkung von Äthylmethansulfonat auf Chlamydomonas reinhardii
Molec. Gen. Genetics 101 (1968), 212 - 216

Robisch G., O. Schimmer, W. Göggelmann:
Aristolochic acid is a direct mutagen in Salmonella typhimurium
Mut. Res. 105 (1982), 201 - 204

Robisch G., O. Schimmer, W. Göggelmann:
Aristolochic acid is a direct mutagen in Salmonella typhimurium
Mut. Res. 113 (1983), 246 - 247

Roper J.A.:
Aspergillus nidulans
in: De Serres F.J., A. Hollaender (eds): Chemical Mutagens, Vol. 2, Plenum Press, New York, London (1971), 343 - 363

Rosen H., M.M. Rehn, B.A. Johnson:
The effect of caffeine on Chlamydomonas reinhardii
I Enhancement of recombination repair
Mut. Res. 70 (1980), 301 - 309

Rosenkranz H.S., W.T. Speck:
Mutagenicity of metronidazole: Activation by mammalian liver microsomes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 66 (1975), 520 - 525

Rosenkranz H.S., W.T. Speck:
Activation of nitrofurantoin to a mutagen by rat liver nitroreductase
Biochem. Pharmacol. 25 (1976), 1555 - 1556

Rosenkranz H.S.:
Direct-acting mutagens in diesel exhausts:
Magnitude of the problem
Mut. Res. 101 (1982), 1 - 10

Rosenkranz H.S., R. Mermelstein:
Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes
All nitro containing chemicals were not created equal
Mut. Res. 114 (1983), 217 - 267

Sachs L. :
Statistische Methoden
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979)

Salmeen J., P. Zacmanides, J. Ball:
1-Nitropyrene reduction by Salmonella typhimurium, V79
Chinese hamster and primary rat liver cells
Mut. Res. 122 (1983), 23 - 28

Schimmer O., C.G. Arnold:
Untersuchungen über Reversions- und Segregationsverhalten
eines außerkaryotischen Gens von Chlamydomonas reinhardii
zur Bestimmung des Erbträgers
Molek. Gen. Genet. 107 (1970), 281 - 290

Schimmer O., R. Werner:
Mutagenic effect of aflatoxin B_1 on nuclear and extranuclear
DNA in Chlamydomonas reinhardii
Mut. Res. 26 (1974), 423 - 425

Schimmer O., R. Loppes:
Foreward mutations induced by nitrosoguanidine during the
synchronized cell cycle of Chlamydomonas reinhardii
Mol. Gen. Genet. 138 (1975), 25 - 31

Schimmer O.:
Mutagenic effect of xanthotoxin (methoxalen) in the green alga Chlamydomonas reinhardii
Plant. Sci. Lett. 5 (1975), 83 - 88

Schimmer O.:
Schnelltest auf die mutagene Wirkung von Arzneistoffen mit Hilfe eines Algensystems
Dtsch. Apotheker-Zeit. 117b (1977), 203 - 206

Schimmer O., G. Hauber:
Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit von Cumarinderivaten in Chlamydomonas.
I Der Einfluß von Licht verschiedener Wellenlänge auf die Mutationsinduktion durch Xanthotoxin in einer argininbedürftigen Mutante
Mut. Res. 44 (1977), 21 - 31

Schimmer O.:
Natürliche Mutagene in höheren Pflanzen
Dtsch. Apotheker-Zeit. 118 (1978), 1818 - 1823

Schimmer O., R. Beck, U. Dietz:
Phototoxizität und Photomutagenität von Furocumarinen und Furocumarindrogen bei Chlamydomonas reinhardii
Planta medica 40 (1980), 68 - 76

Schimmer O.:
Vergleich der photomutagenen Wirkungen von 5MOP (Bergapten) und 8MOP (Xanthotoxin) in Chlamydomonas reinhardii
Mut. Res. 89 (1981) 283 - 296

Schimmer O.:
Die mutagene und canzerogene Potenz von Furocumarinen
Pharm. in uns. Zeit 1 (1981), 18 - 28

Schimmer O., G. Abel, W. Göggelmann, G. Robisch:
The clastogenic and mutagenic potential of aristolochic acid I and aristolochic acid II in vitro
In Vorbereitung

Schmeiser H.H., B.L.Pool, M. Wiessler:
Mutagenicity of the two main components of commercically available carcinogenic aristolochic acid in Salmonella typhimurium
Cancer Letters 23 (1984), 97 - 101

Schunack W., E. Mutschler, H. Rodelmeyer:
Über das Vorkommen der Aristolochiasäuren I und II in Aristolochia clematitis L. in Abhängigkeit von Jahreszeit und Standort
Pharmazie 22 (1967), 118 - 120

Scott B.R.:
Failure to detect a mutagen activity of 8MOP (in the dark) in strains of Salmonella typhimurium and Escherichia coli
Mut. Res. 40 (1976), 168

Sekizawa J., T. Shibamoto:
Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems
Mut. Res. 101 (1982), 127 - 140

Simmon V.F.:
In vitro assays for recombinogenic activity of chemical carcinogens and related compounds with Saccharomyces cerevisiae D3
J. Natl. Cancer Inst. 62 (1979), 901 - 909

Sladek N.E.:
Therapeutic efficacy of Cyclophosphamide as a function of its metabolism
Cancer Res. 32 (1972), 535 - 542

Sladek N.E.:
Bioassay and relative cytotoxic potency of Cyclophosphamide metabolites generated in vitro and in vivo
Cancer Res. 33 (1973) 1150 - 1158

Song Pill-Soon, K.J. Tabley jr.:
Photochemistry and Photobiology of Psoralens: Review Article
Photochem. and Photobiol. 29 (1979), 1177 - 1197

Stahl E., K. Keller:
On the different ß-Asaron contence of commercial calamus drugs
Pharmazie 36 (1981), 53 - 57

Suggimura T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi, T. Kawachi:
Overlapping of carcinogens and mutagens
in: P.N. Magee et al (eds): Fundamentals in Cancer Prevention
University of Tokyo Press, Tokyo (1978), 191 - 215

Tamaro M., N. Babudri, S. Venturini, B. Pani, F. Bordin:
Mutagenicity in the dark of Furocoumarins after metabolic Activation
Atti Associazione Genetica Italiana 28 (1981), 381 - 383

Taylor J.M., W.J. Jones, E.C. Hagan, M.A. Gross, D.A. Davis, E.L. Cook:
Toxicity of oil of calamus (Jammu variety)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 10 (1967), 405

Theiß I., A. Basler, G. Röhrborn:
Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Äthylnitrosoharnstoff an Nagern und Primaten
Forsch. Ber. d. Landes NRW, Nr. 3121/Fachgr. Medizin
Westdeutscher Verlag (1982)

Tokiwa H., R. Nakagawa, Y. Onishi:
Mutagenic assays of aromatic nitrocompounds with Salmonella typhimurium
Mut. Res. 91 (1983), 321 - 325

Tong S., J.H. Selkirk:
Metabolism of 6-nitrobenzo(a)pyrene by hamster embryo cells and rat liver microsomes
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 33 (1982), 80

Veleminsky J., T. Gichner:
The mutagenic activity of nitrosamines in Arabidopsis thaliana
Mut. Res. 5 (1968), 429 - 431

Vogel E., A.T. Natarajan:
The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I.Recessive lethal mutations and translocations in Drosophila
Mut. Res. 62 (1979), 51 - 123

Vogel E.,A.T. Natarajan:
The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems: interspecies comparisons
in: De Serres F.J., A. Hollaender (eds): Chemical Mutagens, Vol. 7
Plenum Press, New York, London (1982), 295 - 336

Wagner H.U., R. Gompper:
Quinone methides
in: S. Patai (ed): The Chemistry of Quinonoid Compounds
Wiley, New York (1974), 1145 - 1178

Weber G.:
Photochemotherapie
Thieme, Stuttgart (1978)

Wulff H.D.:
Zur Zytologie, geographischen Verbreitung und Morphologie des Kalmus
Arch. Pharmaz. 287 (1954) 529 - 541

Yahagi T., M. Nagao, Y Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, M.Okada:
Mutagenicities of N-Nitrosamines on Salmonella
Mut. Res. 48 (1977) 221 - 130

Zimmermann F.K.:
Detection of genetically active chemicals using various yeast systems
in: Hollaender A. (ed): Chemical Mutagens, Vol. 3
Plenum Press, New York (1973), 209 - 258

Danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Priv. Doz. Dr. O. Schimmer für die Anregung zu dieser Arbeit, seine fördernde Unterstützung bei ihrer Durchführung und seine ständige Diskussionsbereitschaft, Frau Dr. Göggelmann für ihre engagierte Einführung in die Technik des Salmonella/Mikrosomentests, die mir zur Verfügung gestellten Arbeitsmöglichkeiten in ihrem Labor, sowie für wertvolle Diskussionen, nicht zuletzt aber auch der gesamten Arbeitsgruppe sowohl in München als auch in Erlangen für die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Günter Emil R o b i s c h

28. 11. 1954	geboren in Schrobenhausen als erster Sohn des Bauingenieurs Albert Robisch und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Mayrhofer.
1961 - 1965	Besuch der Volksschule in Höchstadt/Aisch
1965 - 1974	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Höchstadt
22. 06. 1974	Abitur
1974 - 1975	Ableistung des Wehrdienstes
07. 10. 1975	Immatrikulation an der Universität Erlangen-Nürnberg Studienfach: Biologie/Chemie LAG
1978	Wechsel des Studienziels, angestrebter Abschluß: Biologie (Diplom)
1980 - 1981	Anfertigung der Diplomarbeit
21. 05. 1981	Diplomprüfung in Biologie
01. 06. 1981	
bis 15. 10. 1981	Beschäftigung als Krankenpflegehelfer in der Chirurgischen Universitätsklinik
seit 15. 10. 1981	Promotionsstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg
15. 10. 1981	
bis 31. 05. 1982	Forschungsaufenthalt bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), Neuherberg, Abteilung Toxikologie
01. 08. 1982	
bis 30. 09. 1982	Übernahme eines Forschungsauftrages für die Firma bionorica GmbH, Nürnberg
seit 01. 11. 1982	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik und pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg
01. 10. 1983	
bis 31. 03. 1984	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen eines DFG-Forschungsvorhabens

COPY PRINT
Klaus Feller
Marquardsenstr. 21
8520 Erlangen
Tel.: 0 91 31 / 24 220